

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE



MĚĎ REDUKUJÍCÍ ÚČINKY METABOLITŮ KVERCETINU
COPPER REDUCING EFFECTS OF QUERCETIN METABOLITES
DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

„Čestně prohlašuji, že předkládaná diplomová práce je mým původním autorským dílem a že jsem ji vypracoval samostatně pod vedením PharmDr. Jany Karličkové, Ph.D. Všechny použité prameny a literatura byly náležitě citovány a jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Jakub Mísař

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych chtěl poděkovat paní PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, vstřícnost při konzultacích a především za cenné rady a věcné připomínky nejen při experimentálním měření v laboratoři, které mi pomohly při vypracování této diplomové práce.

Mé poděkování patří též panu Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za odbornou spolupráci, konzultace problematiky daného tématu a poskytnuté materiály, které mi rovněž pomohly při zpracování této diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat Katedře farmaceutické botaniky a ekologie za dočasné propůjčení laboratoře a tím i možnosti naměření výsledků pro diplomovou práci. Zaměstnancům této katedry děkuji za vstřícné a kolegiální jednání. Vznik této diplomové práce byl podpořen granty GAUK 1220314B, FRVŠ 664/2011/A, výzkumným programem PRVOUK P 40 a projektem SVV 260 293.

OBSAH

1. Abstract.....	6
2. Abstrakt	7
3. Úvod.....	8
4. Cíl práce	9
5. Teoretická část práce	10
5.1. Měď v lidském organismu	10
5.1.1. Význam mědi v lidském organismu.....	10
5.1.2. Proteiny využívající měď	10
5.1.2.1. Ceruloplazmin	10
5.1.2.2. Cytochrom c oxidáza.....	10
5.1.2.3. Metalothioneiny	11
5.1.2.4. Cu/Zn superoxiddismutáza.....	11
5.1.3. Patofyziologické stavy spojené s mědí.....	11
5.1.4. Metabolismus mědi	14
5.2. Flavonoidy, kvercetin a jeho metabolity	16
5.2.1. Flavonoidy	16
5.2.2. Kvercetin.....	17
5.2.3. Přeměna látek v tlustém střevě.....	21
5.3. Redukční účinky metabolitů kvercetinu na měď	24
5.3.1. Volné radikály.....	24
5.3.2. Význam volných radikálů	24
5.3.3. Vznik oxidačního stresu	24
5.3.4. Oxidační stres spojený s mědí.....	24
5.3.5. Fentonova reakce	25
5.3.6. Antioxidanty.....	25
5.3.7. Flavonoidy a volné radikály.....	26
5.3.8. Závislost účinků flavonoidů na jejich struktuře	26
5.3.9. Struktura testovaných metabolitů kvercetinu	27
6. Experimentální část práce.....	30
6.1. Použité vzorce v diplomové práci	30
6.2. Používaný materiál.....	30
6.3. Používané přístrojové vybavení	30
6.4. Používané chemikálie.....	30

6.5. Testované látky	31
6.6. Příprava základních reagenčních a pracovních roztoků	31
6.7. Stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů	32
6.8. Metodický postup pro stanovení schopnosti redukce měďnatých iontů v pufru.....	34
6.9 Statistická analýza.....	35
7. Výsledky	36
7.1. Stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů	36
7.2. Měď redukující účinky testovaných metabolitů kvercetinu	37
7.2.1. Měď redukující účinky floroglucinolu	38
7.2.2. Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxybenzoové	41
7.2.3. Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenyloctové.....	44
7.2.4. Měď redukující účinky 4- methylkatecholu	47
7.2.5. Měď redukující účinky homovanilové kyseliny	50
7.2.6. Měď redukující účinky 3- kumarové kyseliny	53
7.2.7. Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenylpropionové	56
7.2.8. Měď redukující účinky kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové.....	59
7.2.9. Souhrn měď redukujících účinků při pH 4,5.....	62
7.2.10. Souhrn měď redukujících účinků při pH 5,5.....	64
7.2.11. Souhrn měď redukujících účinků při pH 6,8.....	66
7.2.12. Souhrn měď redukujících účinků při pH 7,5.....	68
8. Diskuze	70
9. Závěr	74
10. Seznam použitých zkratk.....	75
11. Seznam použité literatury.....	76

1. Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Candidate: Jakub Mísař

Supervisor: PharmDr. Jana Karlíčková, Ph.D.

Title of Thesis: Copper reducing effects of quercetin metabolites

Copper is an essential trace element in particular due to its ability to easily convert between both redox forms: oxidized (Cu^{2+}) and reduced (Cu^+). Flavonoids are common components of the human diet and they can have positive influence on human health. They are converted into small phenolic acids during digestion by specific bacteria in the colon. Although effects of flavonoids have been extensively studied, the same is not true for their metabolites- phenolic acids.

In this *in vitro* study, eight phenolic acids, which are known metabolites of commonly used flavonoid quercetin, were analyzed for their copper reducing activity at four (patho)physiologically relevant pHs. Simple spectrophotometric method based on an indicator bathocuproinedisulfonic acid disodium salt was used for the assessment reduction of copper ions.

The degree of cupric reduction differed among tested compounds. All *o*- dihydroxycompounds were the most active and achieved 100% of cupric ion reduction in low compound to copper ratio.

In conclusion, based on this study, it appears that metabolites of quercetin can influence the kinetics of copper in human.

KEYWORDS: Quercetin metabolites, Reducing activity, Copper, Bathocuproin, Antioxidants

2. Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Kandidát: Jakub Mísař

Školitel: PharmDr. Jana Karličková, Ph.D.

Název diplomové práce: Měď redukující účinky metabolitů kvercetinu

Měď je esenciálním stopovým prvkem zejména díky své schopnosti jednoduše přecházet mezi svými dvěma redoxními formami: oxidovanou formou (Cu^{2+}) a redukovanou formou (Cu^+). Flavonoidy jsou běžnou složkou lidské stravy a mohou mít pozitivní vliv na lidské zdraví. Během procesu trávení jsou flavonoidy přeměňovány na malé fenolové kyseliny pomocí specifických bakterií v tlustém střevě. Ačkoliv byly vlastnosti flavonoidů doposud rozsáhle studovány, to samé se už nedá říci o jejich metabolitech – fenolových kyselinách.

V této *in vitro* studii jsme analyzovali měď redukující účinky při čtyřech (pato)fyzilogicky relevantních hodnotách pH u osmi fenolových kyselin, které jsou známy jako metabolity běžně užívaného flavonoidu kvercetinu. Pro měření redukčních účinků byla použita jednoduchá spektrofotometrická metoda, založená na indikátoru disodné soli kyseliny bathocuproindisulfonové.

Stupeň redukce mědi se lišil u jednotlivých testovaných sloučenin. Nejaktivnější byly všechny *o*-dihydroxysloučeniny, které dosahovali 100% redukce iontů už při nízkém koncentračním poměru k iontům mědi.

Závěrem vyplývá, že na základě této studie mohou metabolity kvercetinu ovlivňovat kinetiku mědi u člověka.

KLÍČOVÁ SLOVA: Metabolity kvercetinu, Redukující aktivita, Měď, Bathocuproin, Antioxidanty

3. Úvod

Měď je obsažena v lidském organismu pouze v malém množství a denní příjem tohoto prvku také není velký (řádově v miligramech). Přesto hraje měď významnou roli. Podílí se např. na respirační oxidaci, správném vývoji mozku nebo ovlivňuje metabolismus železa. Osud mědi v lidském organismu je poměrně složitý a dosud nebyl plně popsán. Měď se vyskytuje ve dvou redoxních formách. Ve formě redukované jako měďné ionty a ve formě oxidované jako ionty měďnaté. Ať už s nedostatkem či nadbytkem tohoto stopového prvku jsou spojovány určité patologické stavy. Proto je důležité, aby byly hladiny mědi v organismu regulovány.

Flavonoidy jsou sekundární metabolity rostlin. V potravě se nacházejí buď ve formě glykosidu, nebo aglykonu (bez cukerné složky). Podskupinou flavonoidů jsou flavonoly, jejichž základní strukturu tvoří 3-hydroxyflavon. Jedním z flavonolových aglykonů je i kvercetin. Kvercetin se běžně vyskytuje v lidské stravě. Kvercetinové glykosidy jsou v průběhu trávení přeměňovány na kvercetin a následně je štěpen i samotný aglykon. Tato přeměna probíhá v tlustém střevě pomocí mikroorganismů. Zde dochází k vzniku mnoha metabolitů kvercetinu, fenolových kyselin, na které jsme se zaměřili v této diplomové práci.

Volné radikály jsou v poslední době relativně často zmiňované téma. Volný radikál je atom nebo molekula, která obsahuje orbital s nepárovým elektronem. V lidském organismu za určitých okolností plní volné radikály i fyziologické děje a jsou nám prospěšné. V jiných případech však mohou poškozovat důležité komponenty lidského organismu a tím nám škodit. Volné radikály se mohou tvořit různými způsoby a právě volné kovy jako měď a železo v lidském organismu mohou přispívat k produkci těchto volných radikálů v rámci katalýzy Fentonovy reakce. Díky Fentonově reakci se vytváří extrémně reaktivní hydroxylový radikál, který může poškozovat proteiny, mastné kyseliny nebo i samotné nukleové kyseliny. Pokud jsou metabolity kvercetinu schopny redukce iontů kovů, je předpoklad, že mohou Fentonovu reakci navíc ještě potencovat (dochází k regeneraci příslušného kovu). Vedle jejich antioxidačních účinků se tak hovoří i o prooxidačním vlivu. Dle dosavadních znalostí závisí schopnost redukce mědi převážně na počtu volných hydroxylových skupin molekuly a až poté pouze okrajově na jejich lokalizaci.

4. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo kvantifikovat měř redukující účinky vybraných metabolitů kvercetinů (konkrétně se jednalo o floroglucinol, 3- hydroxybenzoovou kyselinu, 3- hydroxyfenyloctovou kyselinu, 3, 4- dihydroxyfenyloctovou kyselinu, 4- methylkatechol, homovanilovou kyselinu, 3- kumarovou kyselinu a 3- hydroxyfenylpropionovou kyselinu) ve čtyřech prostředích s různými hodnotami pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5). Následně bylo cílem převést naměřené výsledky do grafů a doplnit je o statistickou významnost, zpracovanou v rámci Tukey testu mnohonásobného porovnávání. V neposlední řadě bylo cílem určit strukturní závislost mezi testovanými metabolity kvercetinů a jejich příslušnými měř redukujícími účinky.

5. Teoretická část práce

5.1. Měď v lidském organismu

Měď je stopový prvek s mezinárodní chemickou značkou Cu a nachází se ve všech živých organismech. Tento prvek se vyznačuje schopností vyskytovat se ve dvou rozdílných redoxních formách. Ve formě oxidované jako měďnaté ionty (Cu^{2+}) a formě redukované (Cu^+) jako ionty měďné (Hordyjewska et al. 2014). V lidském organismu se vyskytuje cca 100 mg mědi. Každý den se v rámci příjmu potravy zhruba 1 mg vstřebá a následně opět vyloučí žlučí (Štípek 2000). Měď je velmi důležitá, protože hraje esenciální roli v lidském organismu. Může zde velmi dobře sloužit, za určitých okolností však může i škodit. Jedná se o zajímavý paradox.

5.1.1. Význam mědi v lidském organismu

Měď je nezbytným přechodným kovem pro všechny organismy, které vyžadují k životu kyslík (vzhledem k tomu, že měď je kofaktorem redoxních enzymů, podílejících se na respirační oxidaci). Dále je měď využívána při syntéze neurotransmiterů, hraje roli v rámci metabolismu železa a uplatňuje se i v jiných procesech, jako je na příklad rozklad superoxidových radikálů nebo i regulace transkripce (Říha et al. 2013). Měď je také důležitá pro správný vývoj mozku, nervového systému a produkci myelinu (Ahuja et al. 2014).

5.1.2. Proteiny využívající měď

V lidském organismu nalezneme mnoho důležitých proteinů, které pro svou funkci vyžadují právě tento stopový prvek.

5.1.2.1. Ceruloplazmin

Ceruloplazmin je syntetizován a následně sekretován hepatocyty. Podílí se na začlenění až 95% mědi v cirkulaci (Cao et al. 2014). Tento enzym hraje důležitou roli při poskytování mědi periferním tkáním a při následném vylučování mědi z těla. Také ale katalyzuje přeměnu železnatých iontů na železité (v tomto oxidačním stavu jsou poté železité ionty přenášeny transferinem). Hladina ceruloplazminu se dá měřit imunologicky nebo enzymaticky a tímto způsobem lze vyhodnotit tělesná zásoba mědi (Hordyjewska et al. 2014). Normální hladina sérového ceruloplazminu je 0,2- 0,5 g/l. Lidé s Wilsonovou chorobou mají hodnoty sérového ceruloplazminu nižší, méně jak 0,2 g/l (Dusek et al. 2015). Ceruloplazmin zároveň působí jako reaktivní protein akutní fáze, tudíž při stresu, traumatických podmínkách, infekci, zánětech nebo různých chronických onemocněních je jeho koncentrace zvýšená (Hordyjewska et al. 2014).

5.1.2.2. Cytochrom c oxidáza

Jedná se o enzym, který je vázaný ve vnitřní mitochondriální membráně. Tato oxidáza je součástí mitochondriálního dýchacího řetězce, kde se podílí na produkci energie (přijaté živiny

poskytnou elektrony, které jsou ve výsledku převedeny na dvě molekuly vody za uvolnění množství energie, potřebné pro tvorbu ATP). Tento enzym je terminální oxidázou, přičemž redukuje molekulární kyslík na vodu (Štípek 2000). Cytochrom c oxidáza zpracovává více jak 90% molekulárního kyslíku, který je přijat buněčnou a tkáňovou respirací (Srinivasan et al. 2012). Studie ukázaly, že aktivita cytochrom c oxidázy byla snížena v souvislosti s vyčerpáním mědi (Hordyjewska et al. 2014).

5.1.2.3. Metalothioneiny

Metalothioneiny jsou proteiny vážící kovy. Jejich biologickou rolí je detoxikace kovových iontů. Dále se podílejí i na ukládání základních stopových prvků. Tyto enzymy vážou zejména měď, zinek a kadmium, nicméně měď je z těchto prvků vázána nejpevněji a ostatní ionty může i vytlačit. Metalothioneiny jsou indukovány při nedostatku mědi a ve stavech, kdy je potřeba udržet aktivitu intracelulárních kuproenzymů jako je na příklad právě cytochrom c oxidáza (Hordyjewska et al. 2014).

5.1.2.4. Cu/Zn superoxiddismutáza

Již z názvu vyplývá, že tento enzym se skládá z jedné podjednotky obsahující měď a druhé podjednotky, která obsahuje zinek. Cu/Zn superoxiddismutáza hraje důležitou roli při dismutaci superoxidu na peroxid vodíku a kyslík. Právě atom mědi zajišťuje transport elektronu z jedné molekuly superoxidu na druhou. Během této operace se měďnaté ionty redukují. Následně znovu dochází k oxidaci měďných iontů. Součástí enzymu je i zinek, ten však nehraje roli při vlastním přenosu elektronů. Jeho funkcí je udržení stability enzymu (Štípek 2000). Zajímavostí je, že enzym Cu/Zn superoxiddismutáza byl objeven již roku 1969 zásluhou Irwina Fridovicha (Indo et al. 2015).

5.1.3. Patofyziologické stavy spojené s mědí

Pokud bychom chtěli hovořit o stavech, kdy nám může měď v lidském organismu škodit, jedná se jak o stav nedostatku, tak i nadbytku.

Nedostatečné množství tohoto prvku není tak častým jevem. Nedostatek mědi je spojen se zkrácením života erytrocytů a s nižší absorpcí železa, což může vést k anémii (Jordán 2001). Na druhou stranu, nadměrná hladina mědi je v organismu také škodlivá, zejména díky schopnosti mědi katalyzovat Fentonovu reakci, v rámci které dochází k produkci hydroxylového radikálu. Tento radikál je extrémně reaktivní. Při nadbytku mědi hovoříme o jejím prooxidačním efektu (Štípek 2000).

I z tohoto důvodu musí být hladina mědi pečlivě regulována. Narušení homeostázy mědi vede k různým patofyziologickým důsledkům na úrovni lokální nebo i systémové (Říha et al. 2013).

Lokální poruchy homeostázy

Lokální poruchy homeostázy mědi mohou být patologicky závažné. Tyto poruchy jsou spojovány se závažnými patofyziologickými stavy, jakými jsou neurodegenerativní onemocnění, nádory, zánětlivá onemocnění nebo i akutní infarkt myokardu. Zejména pak přebytek mědi v organismu je velmi toxický, vzhledem ke schopnosti volné mědi potencovat tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS), a tudíž podpoření tvorby oxidačního stresu (Říha et al. 2013).

- **Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je nejběžnější formou demence, kde se zvyšujícím se věkem dochází k zvýšení prevalence této choroby (Squitti et al. 2014). Vzájemné interakce mezi redukcí schopnými ionty mědi a β -amyloidem jsou spojeny s tvorbou reaktivních forem kyslíku. To vede k oxidačnímu stresu a poškození neuronů. I přes intenzivní studie stále nebylo prokázáno, jakým mechanismem vznikají volné radikály právě mezi ionty mědi a β -amyloidem (Parthasarathy et al. 2014).

- **Parkinsonova choroba**

Parkinsonova choroba je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění a opět zde svou roli hraje měď. Volná měď je v tomto případě znovu spojena se zvýšeným oxidačním stresem, oligomerizací α -synukleinu a tvorbou Lewyho tělísek. U pacientů s Parkinsonovou chorobou byla nalezena snížená hladina mědi a zvýšená hladina železa v substantia nigra a nucleus caudatus. Jak již bylo řečeno, měď pomocí feroxidázové aktivity ceruloplazminu ovlivňuje hladiny železa. Také se hovoří o schopnosti mědi modulovat funkci NMDA a GABA_A receptorů. Doplnění mědi by zde tak mohlo vyvolat pozitivní efekt (Montes et al. 2014).

- **Nádorové onemocnění**

V dnešní době je známo, že oproti zdravým jedincům mají onkologičtí pacienti zvýšené hladiny mědi v séru a v nádorových tkáních (Jomova et al. 2011). Na příklad u pacientů s rakovinou prostaty jsou zvýšené sérové hladiny mědi (Safi et al. 2014). Zajímavostí je, že studie se zabývaly i stanovením koncentrace ostatních kovů u pacientů s nádorovým onemocněním. Ačkoliv hladiny mědi byly zvýšené, u ostatních kovů (železo, selen, zinek) došlo ke snížení jejich koncentračních hladin (Jomova et al. 2011).

Systémové poruchy homeostázy

Narušení systémové homeostázy mědi je relativně dobře známo díky genetickým odchylkám, vyskytujících se u člověka. Hovoříme především o Wilsonově a Menkesově chorobě (Říha et al. 2013).

- **Wilsonova choroba**

Jedná se o autozomálně recesivní odchylku, způsobenou mutací genu pro ATP7B (Sezer et al. 2014). Prevalence Wilsonovy choroby není zcela známa, zatím probíhaly jen menší studie v Evropě a ve Spojených státech. Incidence je odhadována na 1:30 000. Zajímavostí je, že u států s nižší migrací obyvatel se setkáváme s vyšším výskytem Wilsonovy choroby. Např. incidence na Kanárských ostrovech 1:2600, ve Spojeném království 1:7000 nebo v Japonsku 1:10 000 (Dusek et al. 2015). Tato mutace genu ATP7B postihuje jaterní exkreci mědi, což má za následek zvýšenou kumulaci tohoto prvku právě v játrech. Dále se měď hromadí v centrálním nervovém systému, rohovce nebo v ledvinách (Sezer et al. 2014). Nejčastěji se s touto nemocí setkáváme mezi pátým a třicátým rokem života, do té doby může probíhat i asymptomaticky. V mladším věku se pak Wilsonova choroba projevuje zejména symptomy, spojenými s poškozením jater (akutní hepatitida, cirhóza jater s portální hypertenzí, hepatomegalie nebo abnormálními hodnotami sérových aminotransferáz). Neurologické projevy se objevují častokrát až ve třetí dekádě života, patří sem akinetický syndrom podobný Parkinsonově chorobě, třes nebo jiné poruchy hybnosti (Patil et al. 2013). Pokud by byla tato genetická odchylka neléčená, její následná progresse by mohla být až fatální. Pokud je však měď v těle snížena na netoxickou hladinu, je tato choroba částečně léčitelná a většina pacientů může žít prakticky normální život (Brewer 2014).

Diagnostika Wilsonovy choroby je založena na měření hladiny sérového ceruloplazminu, dále sérových hladin mědi a čtyřadvacetihodinovém měření močové exkrece mědi. Diagnóza může být následně potvrzena genetickými testy (Dusek et al. 2015).

Léčba probíhá pomocí chelátorů mědi jako jsou penicilamin nebo trientin. Přestože jsou tyto látky účinné, mají závažné vedlejší účinky, zejména tedy penicilamin. Uplatnění v léčbě nachází i zinek, který působí mechanismem blokování střevní absorpce pro měď. Dále byl vyvinut unikátní lék tetrathiomolybdát, který je schopen s mědí tvořit komplexy a používá se pro akutní neurologické ataky Wilsonovy choroby. Existují studie, které hovoří o schopnosti tetrathiomolybdátu léčit i určité pokročilé a metastatické nádory, na které se dosud pohlíželo jako na prakticky nevléčitelné (Brewer 2014). Pacienti s Wilsonovou chorobou by zároveň měli během léčby držet dietu, která klade důraz na omezení potravin s vysokým obsahem mědi (Patil et al. 2013).

- **Menkesova choroba**

Tato genetická odchylka je vázaná na X- chromozom (na rozdíl od Wilsonovy choroby). Někdy je též Menkesova choroba známá pod názvem „kinky hair syndrom“. Toto velmi závažné neurodegenerativní onemocnění je spojeno s mutací genu ATP7A a s ní spojeným nedostatkem mědi v mozku, játrech a v séru (Ghosh et al. 2014). Požadavky na přítomnost mědi jsou obzvláště důležité v prvním roce života, kdy obvykle dochází k rychlému růstu mozku (Ahuja et al. 2014).

Těžší formy tohoto onemocnění vedou k smrti již v raném dětství. Správná lékařská péče s ovlivněním hladin mědi v organismu mohou prodloužit věk pacienta na více jak třináct let (Tümer et al. 2010). Menkesova choroba se vyznačuje symptomy jako jsou křeče, hypotonie, na první pohled zřetelně pokroucené vlasy, abnormality pojivové tkáně a progresivní mozková atrofie (Ahuja et al. 2014).

Léčba probíhá snahou o substituci mědi. Její orální podání je neúčinné, protože měď je pak uvězněna ve střevech z důvodu nefunkční ATPázy ATP7A, která slouží k přenosu mědi do cirkulace. Měď tedy musí být doplňována parenterálně nebo subkutánně. Největší efekt měla suplementace měď-histidinem v závislosti na době zahájení léčby a přítomnosti alespoň částečně funkční ATPázy ATP7A (Tümer et al. 2010).

5.1.4. Metabolismus mědi

Příjem mědi

Průměrný příjem mědi u dospělého člověka se pohybuje mezi 0,6 a 1,6 mg za den. Hlavními zdroji tohoto esenciálního prvku jsou játra a měkkýši, dále potom i semena, zrna, oříšky nebo fazole (Hordyjewska et al. 2014). Následující upravená tabulka (Tabulka 1) ukazuje potraviny s nejvyšším obsahem biodostupné mědi. Způsob přípravy a uskladnění těchto potravin má samozřejmě také vliv na kvantitativní příjem mědi (Squitti et al. 2014).

Potravinový produkt (100g)	Obsažená měď (mg)
Telecí játra	15
Ústřice	1- 8
Sezamová semínka	4,1
Kakao	3,8
Kešu ořechy	2,2
Kalamáry (mořské plody)	2,1
Slunečnicová semínka	1,8
Sušená rajčata	1,4
Dýně	1,4
Bazalka (sušená bylina)	1,4

Tabulka 1: Potraviny s nejvyšším obsahem biodostupné mědi (Squitti et al. 2014)

Samozřejmě i různé stravovací návyky a chování mohou ovlivnit absorpci mědi u člověka. Na příklad bylo zjištěno, že určitá prebiotika (ať už přirozeně se vyskytující nebo i ty, které jsou do potravin dodatečně přidávány) mají pozitivní vliv na absorpci mědi. Můžeme jmenovat např. fruktooligosacharidy s krátkým řetězcem, pektin nebo inulin. Naopak nedávné studie ukázaly, že pacienti, kteří používali na protézy krém obohacený zinkem, trpěli progresivní myeloneuropatií, která byla způsobena nedostatkem mědi (Hordyjewska et al. 2014).

Absorbce mědi

Osud mědi v lidském těle je komplexní a dosud nebyl plně objasněn. V potravě se tento stopový prvek vyskytuje nejčastěji ve formě měďnatých iontů (Gaetke et al. 2014). Měď je absorbována ze stravy hlavně v duodenu, přesto se ale předpokládá, že část absorpce probíhá i v žaludku a v distální části tenkého střeva. Uptake mědi do enterocytů je řízen především lidským transportním proteinem 1 (CTR1). Měď při své cestě lidským organismem vícekrát změni svůj oxidační stav. Na příklad k redukci dochází již při absorpci, kde důležitou roli hrají reduktázy, které jsou přítomny v apikální membráně enterocytů. Jejich úkolem je tedy redukce měďnatých iontů na ionty měďné. Transport mědi v enterocytech je zprostředkován pomocí chaperonů. Pro vstup do cirkulace poté slouží specifická měď- transportní ATPáza (ATP7A) (Říha et al. 2013). Tento transportér (stejně pak jako ATP7B) je spojen s hydrolýzou ATP. Měď z cytosolu tímto způsobem prochází skrze membrány buněk (Lutsenko et al. 2008).

Distribuce a eliminace mědi

Absorbovaná měď je transportována do jater ve vazbě na α 2- makroglobulin nebo albumin. Studie na buněčných liniích ukazují, že α 2- makroglobulin dodává měď především pro přenašeč CTR1, zatímco albumin poskytuje tento kov jiným mechanismem, doposud ne zcela definovaným. Příjem měďnatých iontů vyžaduje nejdříve jejich redukci, protože CTR1 přenáší pouze měď v redukované formě měďných iontů (Cu^+) (Collins et al. 2010). Měď přijatá játry tak může být buď uložena v hepatocytech, sekretována do plasmy nebo exkretována žlučí. (Gaetke et al. 2014). Uvnitř jaterní buňky je tento stopový prvek vázán na chaperony ATOX1, CCS a COX17. CCS dodává měď pro superoxiddismutázu, přes COX17 putuje měď do mitochondrií pro cytochrom c oxidázu. Chaperon ATOX1 zprostředkovává přenos iontů mědi do Golgiho aparátu a následně přes ATP7B slouží buď k zabudování mědi do ceruloplazminu, nebo exkreci mědi žlučí (Collins et al. 2010). Nejčastěji je měď v jaterních buňkách vázána na metalothioneiny nebo začleněna do kuproenzymů. Pro transport mědi k jiným tkáním slouží především ceruloplazmin (Gaetke et al. 2014). Právě v jaterních buňkách se ceruloplazmin také vytváří. Ceruloplazmin spojuje 6 atomů mědi a jednou z jeho rolí je zásobování mědi potřebné periferní tkáně. Tento enzym má navíc feroxidázovou aktivitu, pomocí které oxiduje železnaté ionty na železité. Tento jev je důležitý pro přenos železa na transferin (Štípek 2000).

Je-li koncentrace mědi v organismu zvýšena, ATP7B je přerazen do vezikulárního kompartmentu, kde se podílí na exkreci mědi žlučí (Wijmenga 2004). Menší množství je také vyloučeno potem a močí (Turnlund 1998). Denní exkrece mědi močí bývá běžně v rozmezí 0- 20 $\mu\text{g}/24$ hodin. Pro pacienty s Wilsonovou chorobou je typická zvýšená exkrece močí, kde bývá koncentrace mědi vyšší jak 100 $\mu\text{g}/24$ hodin (Dusek et al. 2015). Exkrece mědi však nebyla doposud zcela pochopena (Wijmenga 2004).

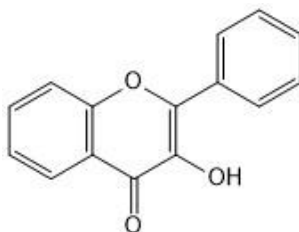
5.2. Flavonoidy, kvercetin a jeho metabolity

5.2.1. Flavonoidy

Tyto sekundární metabolity rostlin jsou benzopyranové deriváty, které jsou zastoupeny u fotosyntetizujících buněk (Mladěnka et al. 2010). Flavonoidy se vyskytují buď jako glykosidy (s připojenými cukry jako glykosylovými skupinami), nebo jako aglykony (bez připojených cukrů) (Kelly 2011). Flavonoidy patří mezi nejčastěji zastoupené antioxidanty, které nalezneme v běžné stravě. V lidské stravě bylo identifikováno přes 4000 různých flavonoidů. Hlavními zdroji jsou jablka, cibule, moruše, červené ovoce, citrusy, ořechy, ale i čokoláda a nápoje jako je čaj, pivo nebo víno (Mladěnka et al. 2010). Vlastnosti flavonoidů byly relativně dobře prostudovány, to už ale neplatí pro jejich metabolity, které jsou vytvářeny po vlastním požití. Dalo by se říci, že se svým způsobem jedná o jakési přírodní proléčiva. Absorbce však není velká, pouze 2- 15% požitých flavonoidů je absorbováno z horní části GIT. (Gao et al. 2006)

Flavonoly a strukturní vlastnosti

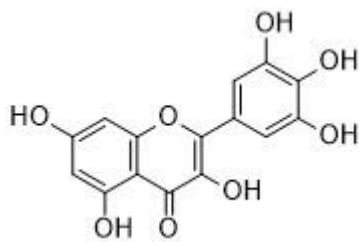
Flavonoly jsou podskupinou flavonoidů, jejichž základní strukturu tvoří 3- hydroxyflavon (Vzorec 1).



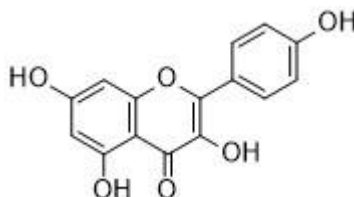
Vzorec 1: 3-hydroxyflavon (základní struktura flavonolů)

Následná substituce funkčními skupinami pak určí, zda je flavonol typu kvercetinu nebo na příklad typu kempferolu, myricetinu a dalších. Právě glykosidy těchto flavonolů zaujmají největší část dietního příjmu flavonolů. Menší část příjmu potravy tvoří i jejich aglykony. Kvercetin (Vzorec 2) má hydroxylovou skupinu v pozici 3, 5, 7, 3' a 4'. Rozdíl mezi kvercetinem a myricetinem (Vzorec 4) je takový, že myricetin má navíc hydroxyskupinu v pozici 5'

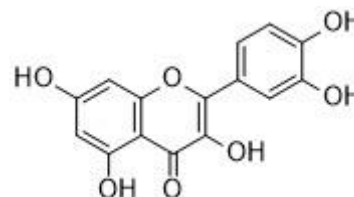
(Kelly 2011). Naopak kempferol (Vzorec 3) má ve vedlejším aromatickém kruhu B pouze jednu hydroxyskupinu a to v poloze 3'.



Vzorec 4: *Myricetin*



Vzorec 3: *Kempferol*



Vzorec 2: *Kvercetin*

5.2.2. Kvercetin

3, 5, 7, 3', 4'- pentahydroxyflavon (triviálním názvem kvercetin) je hlavním dietním flavonoidem flavonolového typu (Terao et al. 2011).

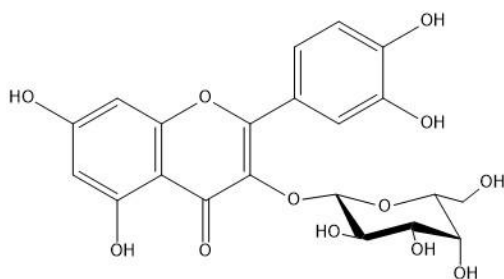
Fyzikální a chemické vlastnosti

Dle definice je kvercetin aglykon (Vzorec 6), postrádá tedy připojený cukr. Jedná se o sloučeninu citronově žluté barvy, která je zcela nerozpustná ve studené vodě, špatně rozpustná v horké vodě avšak zcela rozpustná v alkoholech a tucích (Kelly 2011).

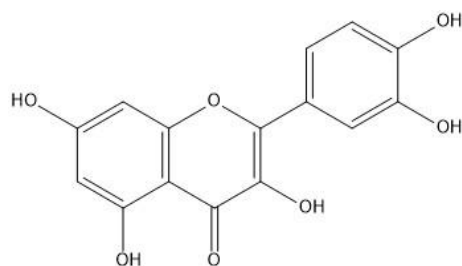
Kvercetinové glykosidy

Kvercetinový glykosid je tvořen připojením glykosylové skupiny, kterou je cukr jako glukóza, rhamnóza, rutinóza a další. Náhrada glykosylovou skupinou proběhne za jednu hydroxylovou skupinu, obvykle v poloze 3. Tato připojená glykosylová skupina má vliv na rozpustnost, absorpci i účinky *in vivo*. Obecně platí, že přítomnost glykosylu znamená vyšší rozpustnost ve vodě v porovnání s aglykonem samotným (Kelly 2011).

Právě typ glykosylové skupiny odlišuje jednotlivé kvercetinové glykosidy. Na příklad glykosid s 3- O- galaktosidovou skupinou se nazývá hyperosid (Vzorec 5) (Kelly 2011). Hyperosid se nachází na příklad v rostlinách jako je třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae), zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*, Asteraceae) nebo bez černý (*Sambucus nigra*, Sambucaceae) (Rice- Evans et al. 2003). Glykosid s 3- O- glukosidickou skupinou je isokvercitrin (Kelly 2011). Vyskytuje se v rostlinách jako je měsíček lékařský (*Calendula officinalis*, Asteraceae) nebo zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*, Asteraceae) (Rice- Evans et al. 2003). Cukernou složku rutinózu v poloze 4 má glykosid rutin (Kelly 2011), který je poměrně bohatě obsahově zastoupen v rostlině pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*, Polygonaceae) (Hosseinzadeh et al. 2014).



Vzorec 5: Glykosid hyperosid



Vzorec 6: Aglykon kvercetin

Výskyt kvercetinu v potravě

Kvercetin se hojně nachází v ovoci a zelenině jako jsou cibule, hlávkový salát, zelí, brokolice, fazole, jablka nebo pohanka. Dále se nachází i v nápojích jako je čaj nebo červené víno. Největší podíl denního příjmu zaujímá právě příjem z cibule. V cibuli je přítomen kvercetin ve své glykosidové formě. V západních populacích je odhadovaný denní příjem celkových flavonolů v rozmezí 20- 50 mg za den, z toho právě zhruba 10- 20 mg denně odpovídá kvercetinovým glykosidům (Terao et al. 2011). Kvantitativní příjem kvercetinu ve vybraných potravinách shrnuje následující upravená tabulka (Tabulka 2):

Potravina	Obsah kvercetinu (mg. 100g ⁻¹)
Kapary	233,00
Cibule	22,00
Kakaový prášek	20,00
Brusinky	14,00
Vařený chřest	7,61
Borůvky	5,05
Jablka (odrůda Red delicious)	4,70
Zelený čaj	2,69
Třešně	2,64
Brokolice (syrová)	2,51
Jablka (odrůda Fuji)	2,02
Černý čaj	1,99
Červené hrozny	1,38

Tabulka 2: Obsah kvercetinu ve vybraných potravinách (Larson et al. 2012).

Příjem kvercetinu

Dietní příjem kvercetinu, ať už jako aglykonu nebo ve formě různých glykosylovaných podob, je tedy omezen na několik miligramů za den. Koncentrace cirkulujících molekul a jeho metabolitů jsou velmi nízké (řádově nanomolární množství). To je relativně málo, pokud požadujeme, aby se vyvinula určitá biologická aktivita. I přesto se na vědecké scéně tato molekula těší stále větší oblibě. Vyhledávání v databázi PubMed.gov nachází více než dva tisíce článků za posledních deset let s termínem „quercetin“, obsaženým v názvu. Tento trend navíc v průběhu let i nadále roste. Zájem o molekulu pravděpodobně spočívá v její pleiotropní povaze. Díky této schopnosti může látka působit i pomocí dalších meziproduktů na různé cesty v organismu, které se poté svým působením sbíhají na společných cílech. Konečné působení tak může být výsledkem aditivního a synergického efektu (Russo et al. 2014).

Účinky kvercetinu

Zdá se, že kvercetin má mnoho potencionálně blahodárných účinků na lidské zdraví. Na některé účinky byly již provedeny i klinické studie (např. studie vlivu na krevní tlak). Na příklad nádorové onemocnění a jiné oblasti jsou ve fázi výzkumu nebo preklinických studií (Kelly 2011).

- **Antioxidační účinky**

Na antioxidační potenciál kvercetinu se zaměřilo množství *in vitro* i *in vivo* studií na zvířatech. Jsou důkazy o antioxidačním vlivu kvercetinu, čímž může chránit před oxidačním stresem mozek, srdce i ostatní tkáně (Kelly 2011).

- **Antihypertenzní účinky**

Kvercetin byl schopný v *in vitro* studii inhibovat angiotenzin konvertující enzym (ACE). Mechanismus této inhibice pravděpodobně spočívá v schopnosti kvercetinu chelatovat kovy jako je právě zinek. Zajímavé je, že podobným mechanismem působí dnes některá antihypertenziva. Na příklad kaptopril nebo imidapril inhibují ACE vazbou na atom zinku, kde je aktivní místo enzymu. To zapříčiní, že je zpomalena přeměna angiotenzinu I na angiotenzin II, čímž je ovlivněn renin- angiotenzin- aldosteronový systém, který má vliv na regulaci krevního tlaku (Larson et al. 2012).

- **Antialergenní účinky**

Během *in vitro* studie kvercetin inhiboval uvolňování histaminu z žírných buněk a bazofilů, což naznačuje jeho antialergenní účinek. Bylo provedeno několik studií u morčat, kde inhalačně podávaný kvercetin měl určitou antiastmatickou aktivitu. U myších modelů docházelo ke snížení eozinofilů a neutrofilů v plicní tkáni, tím se tlumila astmatická reakce (Kelly 2011).

- **Protirakovinové účinky**

Byly provedeny studie *in vitro* a *in vivo* (na zvířecích modelech), které se pokoušely zjistit vliv kvercetinu na onemocnění rakovinou. *In vitro* existují důkazy, že kvercetin může působit vícero protinádorovými účinky. Včetně antioxidačního efektu se hovoří také o antiproliferačních a proapoptotických účincích, dále o potlačení růstového faktoru i potenciálnímu synergismu s některými chemoterapeutiky. Zejména prospěšný se jevil kvercetin z hlediska předcházení vzniku nádorů tlustého střeva (Kelly 2011).

- **Další účinky kvercetinu**

Kvercetin dokonce vykazoval účinky, které by mohly ovlivnit metabolické onemocnění diabetes mellitus. Aldózoreduktáza je enzym, který katalyzuje přeměnu glukózy na sorbitol. Tento enzym je důležitý zejména při patogenezi šedého zákalu u diabetiků. Kvercetin inhiboval *in vitro* tento enzym v čočce a efektivně blokoval akumulaci polyolů. Bylo také pozorováno, že kvercetin částečně snižuje hladinu cukru v krvi (Kelly 2011).

Dále byl kvercetin *in vitro* schopen slabě inhibovat růst *Helicobacter pylori*. Při jiných *in vitro* studiích zase kvercetin inhiboval produkci prozánětlivých enzymů cyklooxygenázy (COX) a lipoxygenázy (LOX). *In vivo* se kvercetin jeví jako inhibitor CYP3A4 a P-glykoproteinu (Kelly 2011). Některé zdroje hovoří i o ovlivnění enzymů CYP1A2, CYP2C9 a CYP2D6 (Davies et al. 2013). Při vzájemném podání s určitými léčivy by tak mohl ovlivnit jejich farmakokinetiku.

Metabolismus kvercetinu v lidském organismu

Absorbce

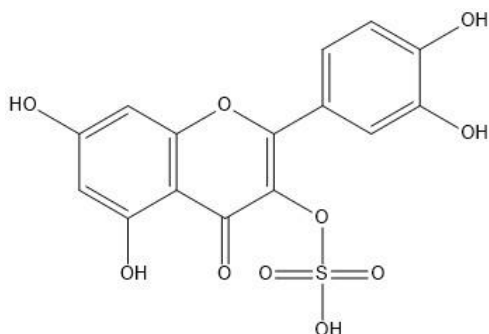
Potravou přijatý glykosylovaný kvercetin je hydrolyzován na svůj aglykon částečně již slinami. Až však epitelové buňky v tenkém střevě představují hlavní místo pro hydrolyzu kvercetinových glykosidů. Po hydrolyze pomocí phlorizin- hydrolázy (vyskytující se na povrchu buněk) nebo intracelulární β - glukosidázy tak může dojít k absorpci ze střeva. Tato absorbce je však nepatrná, většina těchto sloučenin se vrací zpět do zažívacího traktu působením specifických transportních systémů (Russo et al. 2014).

Přestup přes membránu

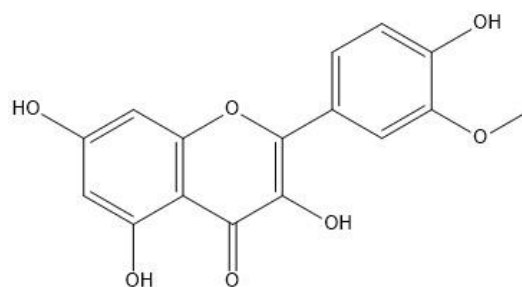
Rozdělovací koeficient (logP, oktanol- voda) hraje ve prospěch kvercetinového aglykonu (v porovnání s jeho glykosidy). Glykosidy vykazují větší hydrofilitu. Hydrofilní skupiny tak musí být následně odstraněny pomocí buněčné glykosidázy a až poté může molekula procházet přes biologické membrány pomocí pasivní difúze (Russo et al. 2014). Studie, která se zabývala vstřebáváním těchto látek, však zjistila, že glykosidy byly vstřebávány více než samotný aglykon. Přenos do střevních buněk je pravděpodobně zajištěn i pomocí na sodíku závislém přenašeči SGLT- 1 (Slanina 2004).

Metabolismus

Po hydrolyze je vytvořený aglykon následně metabolizován v rámci absorpce enzymatickou fází II, která probíhá v buňkách střevního epitelu a v jaterních buňkách. Kvercetinový aglykon je převeden na různé konjugované sloučeniny (sulfátové a glukuronidové konjugáty v závislosti na glukuronové kyselině). Zde dochází k produkci hlavních konjugátů kvercetinu u lidí. Jedná se o 3- O- methylkvercetin (isorhamnetin, Vzorec 7), kvercetin- 3- O- glukuronid, isorhamnetin- 3- O- glukuronid, kvercetin- 3'- O- sulfát (Vzorec 8) a kvercetin glutathion. Metabolity kvercetinu pak přes jaterní portální žílu dosáhnou jater, kde je metabolická přeměna dokončena (Russo et al. 2014).



Vzorec 8: Kvercetinsulfát



Vzorec 7: Isorhamnetin (3- O- methylkvercetin)

Díky komplexním konjugačním reakcím tak dojde zcela k detoxikaci kvercetinu. V tomto smyslu je kvercetin v lidském těle rozpoznáván jako xenobiotikum (Terao et al. 2011). Bylo zjištěno, že velká část přeměny na aglykon proběhne na úrovni střeva.

5.2.3. Přeměna látek v tlustém střevě

Kvercetinové glykosidy v jiné než glukosylované formě (např. rutin) dosahují tlustého střeva, aniž by podléhaly absorpci v tenkém střevě nebo vůbec nepodléhají hydrolyze na aglykon (Terao et al. 2011). Flavonoidy tak mohou dosáhnout tlustého střeva dvěma způsoby, buď jako neabsorbovatelné glykosidy (skrže tenké střevo pouze prochází), nebo flavonoidy, které byly nejprve absorbovány a následně jsou vyloučeny jako konjugáty žlučí a prochází tenkým střevem. V tlustém střevě je absorpce a metabolismus kvercetinu složitější, protože se ho účastní enterobakterie. Bakteriální glykosidázy, glukuronidázy a sulfatázy odstraní všechny zbývající glykosidy, glukuronidy a sulfáty z flavonoidní molekuly (Gao et al. 2006). Flavonoidní aglykon je rozštěpen v pozici pyranového uspořádání. Zde tedy vznikají další metabolity, fenolové kyseliny. Ty pak dále v tlustém střevě podléhají dehydroxylaci (Slanina 2004).

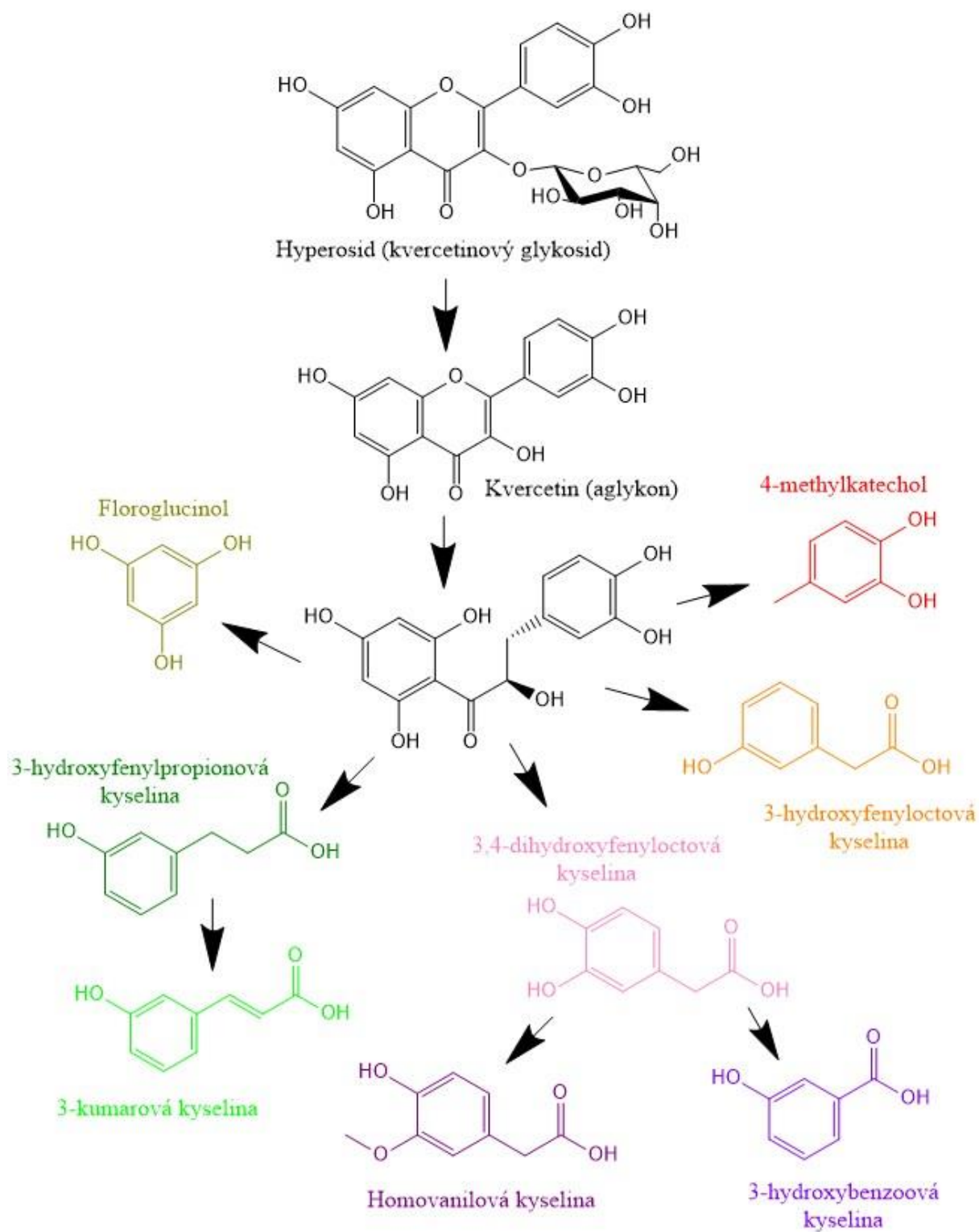
Je zde určitý předpoklad, že tyto jednoduché fenolové sloučeniny mohou být absorbovány do krevního řečiště a následně exkretovány močí. Mohou tak přispívat ke zdravotním benefitům

při příjmu flavonoidů. Byly prokázány zvýšené hladiny fenolových kyselin (zejména kyseliny 3- hydroxyfenyloctové a kyseliny 3- methoxy- 4- hydroxyfenyloctové) v moči a v plasmě po požití potravy bohaté na flavonoidy (Gao et al. 2006).

Bylo zjištěno, že bakteriální přeměna probíhá pomocí následujících bakterií. Na příklad bakterie *Bacteroides JY- 6*, *Fusobacterium K- 60* a *Eubacterium YK- 4* přeměňují glykosid rutin na kvercetinový aglykon. Kvercetin je pak přeměňován na fenolové kyseliny pomocí bakterií *Streptococcus S- 2*, *Lactobacillus L- 2*, *Bifidobacterium B- 9* a *Bacteroides JY- 6* (Kim et al. 1998).

Schéma přeměny kvercetinového glykosidu až na jednotlivé fenolové kyseliny znázorňuje upravený Obrázek 1 (Najmanová et al. 2016).

Ve většině případů se tak fenolové kyseliny nenacházejí v rostlinách ve volném stavu, vznikají až v průběhu trávení. Existují však i výjimky, na příklad při kontaminaci mikroorganismy nebo při odchylkách od fyziologického stavu (Rice- Evans et al. 2003).



Obrázek 1: Schéma přeměny kvercetinového glykosidu až na jednotlivé fenolové kyseliny

5.3. Redukční účinky metabolitů kvercetinu na měď

5.3.1. Volné radikály

Téma volných radikálů je v současné době relativně často zmiňováno. Volný radikál definujeme jako částici, ať už atom nebo molekulu, která obsahuje orbital s nepárovým elektronem. Jedná se o reaktivní formy kyslíku a reaktivní formy dusíku (Štípek 2000).

5.3.2. Význam volných radikálů

Na volné radikály se však nemůžeme dívat pouze skepticky. V určitých případech plní fyziologickou roli a tím lidskému organismu dobře slouží. Lze jmenovat účast volných radikálů v mitochondriálním dýchacím řetězci (důležitým enzymem je zde právě kuproenzym cytochromoxidáza). Volné radikály potřebují i makrofágy a neutrofily, které při soupeření s bakteriemi využívají právě produkce hydroxylového radikálu (Štípek 2000). Dalším příkladem fyziologického využití volných radikálů je produkce prostaglandinů nebo procesy detoxifikace v játrech (Aprioku 2013).

Na druhou stranu, v jistých případech může být produkce volných radikálů škodlivá. Reaktivní formy kyslíku a dusíku tak mohou poškodit proteiny, mastné kyseliny (dochází k peroxidaci lipidů) nebo i samotné nukleové kyseliny. Pokud je generováno větší množství volných radikálů, některé buňky organismu spouští svou programovanou smrt - apoptózu. Bylo také zjištěno, že při patologických stavech, spojených s hypoperfúzí tkání jako na příklad akutní infarkt myokardu nebo některé embolické stavy, dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů také (Štípek 2000). Oxidační stres je však spojován i s mnohými dalšími onemocněními jako je diabetes mellitus, revmatoidní artritida, rakovina nebo i arteriální hypertenze (Aprioku 2013).

5.3.3. Vznik oxidačního stresu

Existuje více způsobů, jak mohou být volné radikály vytvářeny. Jedním z nich je produkce superoxidového aniontu díky enzymu xanthinoxidáza z xanthinu, který je spolu s kyselinou močovou odpadním produktem metabolismu purinů. Dalším enzymem, produkujícím volné radikály je i lipoxygenáza, která se uplatňuje při syntéze leukotrienů (Mladěnka et al. 2010). Volné kyslíkové radikály dále produkují intracelulární NADPH-oxidáza nebo enzymy cytochromu P450 (Aprioku 2013).

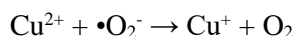
5.3.4. Oxidační stres spojený s měďí

Měď může produkovat oxidační stres dvěma mechanismy, a to buď přímo katalyzovat tvorbu volných radikálů pomocí Fentonovy reakce, nebo další možností zůstává výrazné snížení hladiny glutathionu při zvýšení hladiny mědi. Měďné a měďnaté ionty tak hrají důležitou roli v oxidačních a redukčních reakcích (Štípek 2000).

5.3.5. Fentonova reakce

Pomocí této reakce mohou vznikat volné radikály. Důležitou roli zde hraje peroxid vodíku, který sám o sobě nesplňuje kritéria definice volného radikálu (nemá nepárový elektron). Peroxid vodíku se v lidském organismu běžně vytváří. Pokud je však v jeho přítomnosti kov jako železo nebo měď, pak se peroxid vodíku redukuje a dává vznik hydroxylovému radikálu (Štípek 2000). Hydroxylový radikál je velmi reaktivní a i přestože má jen velmi krátký poločas (řádově nanosekundy), může dojít k vážnému poškození buněk a dalších intracelulárních struktur (Aprioku 2013). Okamžitě tak reaguje s okolními částicemi, kterým odnímá elektron. Pokud je měď vázaná v ceruloplazminu nebo železo vázané na feritin, popřípadě transferin, nehrozí zde nebezpečí regenerace kovu pro opětovnou katalýzu Fentonovy reakce. Volné železité či měďnaté ionty však v přítomnosti superoxidu či jiné biologické látky schopné redukce tuto Fentonovu reakci potencují (Štípek 2000).

Měďnaté ionty tedy mohou být redukovány na ionty měďné v přítomnosti superoxidového radikálu nebo látky, která je schopna tyto ionty redukovat (Ahuja et al. 2014).



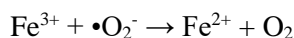
Rovnice 1: Redukce měďnatých iontů v přítomnosti superoxidového radikálu

Redukovaná měď (měďné ionty) jsou schopné katalyzovat produkci reaktivního hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku. Jedná se o již zmíněnou Fentonovu reakci (Ahuja et al. 2014).



Rovnice 2: Fentonova reakce

Fentonova reakce probíhá obdobně i s ionty železa (Foy et al. 2011).



Rovnice 3: Fentonova reakce s ionty železa

5.3.6. Antioxidanty

Antioxidanty můžeme popsat jako látky, které jsou schopné působit právě proti této škodlivé oxidaci v tělesných tkáních. Tyto látky ukončují řetězové reakce odstraněním volných radikálů a inhibují tak další oxidační reakce (Aprioku 2013). Hrají tak významnou roli při vychytávání reaktivních forem kyslíku a dusíku (Alafiatayo et al. 2014). Antioxidanty poskytují volným radikálům elektrony a sami se oxidují. Proto jsou antioxidanty často redukční činidla.

Antioxidanty můžeme rozdělit dle jejich charakteru na enzymatické systémy a na neenzymatické molekuly (Aprioku 2013).

Enzymatické antioxidační systémy

V savcích buňkách je enzymatický ochranný systém tvořen superoxiddismutázou, katalázou, glutathion peroxidázou a glutathionreduktázou.

Neenzymatické antioxidanty

Mimo enzymové systémy existují i další molekuly, schopné antioxidačních účinků. Patří sem na příklad α - tokoferol (vitamín E), kyselina askorbová (vitamín C), kyselina močová, bilirubin nebo melatonin a dále právě i polyfenoly jako jsou karotenoidy a flavonoidy. Ve vodě rozpustné antioxidanty reagují s oxidačními činidly v buněčné cytoplazmě a v krvi, zatímco antioxidanty rozpustné v lipidech chrání membrány buněk před peroxidací lipidů (Aprioku 2013).

5.3.7. Flavonoidy a volné radikály

Flavonoidy jsou známy jako silné antioxidanty se schopností vychytávat reaktivní formy kyslíku, ať už přímo nebo způsobem, kdy účinně inhibují enzymy, které tyto volné radikály mohou tvořit (např. xanthinoxidázu, lipoxygenázu) (Terao et al. 2011). Již byly i provedeny studie, zaměřené na porovnání souvislosti mezi příjmem flavonoidů a redukcí mortality ischemické choroby srdeční, kde mortalita byla opravdu snížena. Známým jevem je i tzv. „francouzský paradox“, kterým je částečně vysvětlována nižší mortalita na kardiovaskulární obtíže ve Francii než v jiných státech s obdobným příjmem živočišných tuků. Definitivní verdikt však nebyl vyřčen, protože u jiných studií nebyly pozorovány tak jednoznačné výsledky (Štípek 2000).

Pokud jsou však flavonoidy (v této práci konkrétně metabolity kvercetinu) schopny redukce iontů kovů, předpokládá se, že mohou vyvíjet prooxidační účinky a tím podpořit generaci volných radikálů. Redukce měďnatých iontů či železitých iontů regeneruje příslušný kov a potencuje Fentonovu reakci (Štípek 2000). Bylo zjištěno, že flavonoidy mají vyšší redukční potenciál k mědi než na příklad k iontům železa (Mladěnka 2010). Měď tedy flavonoidy redukuje snadněji. Dokládá to standardní redoxní potenciál, který je vyčíslen u páru $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ hodnotou +0,15 V (pro srovnání, standardní redoxní potenciál páru $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ činí +0,77 V) (Mira et al. 2002).

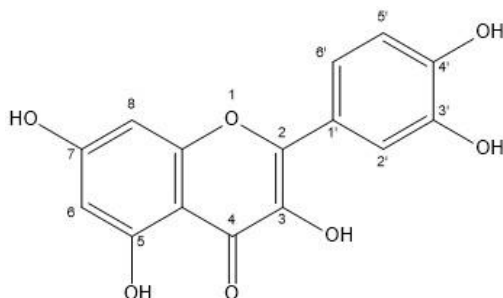
5.3.8. Závislost účinků flavonoidů na jejich struktuře

Strukturní požadavky pro redukční účinky

Dle dosavadních znalostí závisí schopnost flavonoidů redukovat měď převážně na počtu volných hydroxylových skupin a až pak pouze okrajově na jejich lokalizaci (Mladěnka et al. 2011).

Strukturní požadavky pro chelatační účinky

Flavonoidy mají i chelatační účinky. Jsou tedy schopné vytvářet kovový komplex. Zde jsou již strukturní požadavky specifitější než u schopnosti látky redukovat. V molekule dochází k tvorbě komplexu mezi 5- hydroxylovou a 4- karbonylovou skupinou. Další možností je pak chelatace díky 3- hydroxylové a 4- karbonylové skupině, v neposlední řadě je pak tvorba komplexu mezi 3', 4'- dihydroxylovou skupinou, která je umístěna v kruhu B. Poslední chelatační pozice se zdá být preferovanější, na druhou stranu však není možná v kyselém prostředí (oproti předchozím chelatačním místům). Důvodem je disociace obou katecholových skupin v kruhu B, která je zprostředkována díky pH neutrálnímu prostředí (Mladěnka et al. 2011). Vzorec 9 naznačuje číslování molekuly kvercetinu.

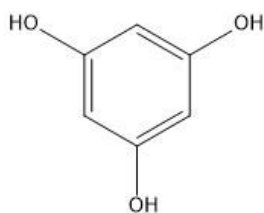


Vzorec 9: Molekula kvercetinu a její číslování

5.3.9. Struktura testovaných metabolitů kvercetinu

- **Floroglucinol**, $M_w = 126,11$

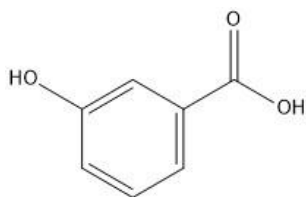
Strukturně se jedná o 1, 3, 5- trihydroxybenzen. Floroglucinol obsahuje na aromatickém jádře tři stejné funkční substituenty.



Vzorec 10: Floroglucinol

- **3- hydroxybenzoová kyselina**, $M_w = 138,12$

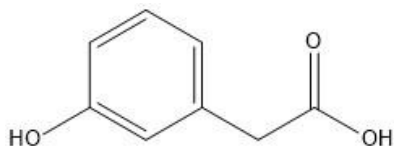
Základ tohoto metabolitu tvoří kyselina benzoová, která je substituována jednou hydroxyskupinou.



Vzorec 11: 3- hydroxybenzoová kyselina

- **3- hydroxyfenyloctová kyselina**, $M_w = 152,15$

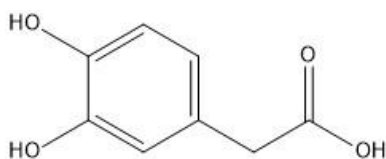
Jedná se opět o monokarboxylovou kyselinu, kde má tento metabolit oproti předchozí 3- hydroxybenzoové kyselině ještě o jeden uhlík delší molekulu. I tato kyselina obsahuje pouze jednu hydroxylovou skupinu.



Vzorec 12: 3-hydroxyfenyloctová kyselina

- **3, 4- dihydroxyfenyloctová kyselina**, $M_w = 168,15$

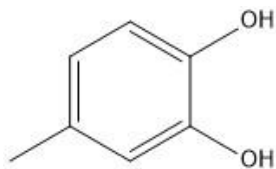
Oproti předchozímu metabolitu (3- hydroxyfenyloctové kyselině) má tato kyselina navíc ještě jednu hydroxyskupinu v poloze 4.



Vzorec 13: 3, 4- dihydroxyfenyloctová kyselina

- **4- methylkatechol**, $M_w = 124,14$

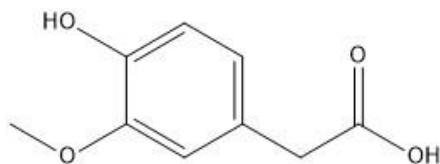
Tento metabolit obsahuje dvě hydroxylové skupiny. Strukturním názvem se jedná o 4- methylbenzen- 1, 2- diol.



Vzorec 14: 4- methylkatechol

- **3- methoxy- 4- hydroxyfenyloctová kyselina**, $M_w = 182,18$

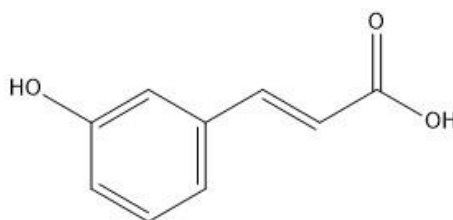
Triviálním názvem se jedná o homovanilovou kyselinu. Tato aromatická kyselina obsahuje jednu hydroxyskupinu a jednu methoxyskupinu.



Vzorec 15: 3- methoxy- 4- hydroxyfenyloctová kyselina

- **3- hydroxyfenylakrylová kyselina**, $M_w = 164,16$

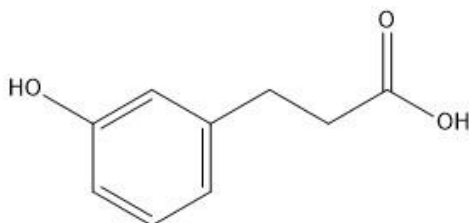
Tato kyselina se triviálním názvem nazývá 3- kumarová kyselina. Obsahuje pouze jednu hydroxyskupinu.



Vzorec 16: 3- hydroxyfenylakrylová kyselina

- **3- hydroxyfenylpropionová kyselina**, $M_w = 166,18$

Tento metabolit společně s kyselinou 3- kumarovou obsahoval ze všech testovaných metabolitů největší počet uhlíkových atomů v molekule. Tato kyselina opět obsahuje jednu hydroxylovou skupinu.



Vzorec 17: 3- hydroxyfenylpropionová kyselina

6. Experimentální část práce

6.1. Použité vzorce v diplomové práci

Veškeré struktury molekul v této diplomové práci byly vytvořeny pomocí programu ChemDraw Professional 15. 0.

6.2. Používaný materiál

- Automatické pipety různého objemu (Brand)
- Vícekanálové pipety různého objemu (Biohit)
- Mikrotitrační destičky (Brand)

6.3. Používané přístrojové vybavení

- Analytické váhy KERN ABT120- 5DM (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- Třepačka pro zkumavky IKA VORTEX GENIUS 3 (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- Třepačka pro mikrotitrační destičky IKA MS 3 digital (IKA®- Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)
- Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi- Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

6.4. Používané chemikálie

- Pentahydrát síranu měďnatého (Sigma- Aldrich)
- Hydroxylamin hydrochlorid (Sigma- Aldrich)
- Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny (Sigma- Aldrich)
- Dimethylsulfoxid (Lach- Ner)
- 15 mM acetátové pufrы o pH 4.5 a 5.5 (připravené z octanu sodného, kyseliny octové a destilované vody).
- 15 mM HEPES pufrы o pH 6.8 a 7.5 (připravené HEPES soli, HEPES a destilované vody).

6.5. Testované látky

- Floroglucinol (Vzorec 10)
- 3- hydroxybenzoová kyselina (Vzorec 11)
- 3- hydroxyfenyloctová kyselina (Vzorec 12)
- 3, 4- dihydroxyfenyloctová kyselina (Vzorec 13)
- 4- methylnatechol (Vzorec 14)
- Homovanilová kyselina (Vzorec 15)
- 3- kumarová kyselina (Vzorec 16)
- 3- hydroxyfenylpropionová kyselina (Vzorec 17)

6.6. Příprava základních reagenčních a pracovních roztoků

Příprava základního roztoku měďnatých iontů o koncentraci 5 mM

Surovinu pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M_w = 249,69 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství destilované vody pro danou koncentraci 5 mM. Tento roztok byl dostatečně stabilní a byl uchováván v lednici.

Příprava roztoku hydroxylamin hydrochloridu o koncentraci 10 mM

Surovinu hydroxylamin hydrochlorid ($M_w = 69,49 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství destilované vody pro zadanou koncentraci 100 mM. Poté jsme roztok dále zředili destilovanou vodou na v experimentu používanou koncentraci 10 mM. Tento roztok byl dostatečně stabilní a byl uchováván v lednici.

Příprava roztoku hydroxylamin hydrochloridu o koncentraci 1 mM

Surovinu hydroxylamin hydrochlorid ($M_w = 69,49 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství destilované vody pro zadanou koncentraci 100 mM. Poté jsme roztok dále zředili destilovanou vodou na v experimentu používanou koncentraci 1 mM. Tento roztok byl dostatečně stabilní a byl uchováván v lednici.

Příprava roztoku disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny o koncentraci 5 mM

Surovinu disodnou sůl bathocuproindisulfonové kyseliny ($M_w = 564,54 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) jsme dle navážky rozpustili v potřebném množství destilované vody pro danou koncentraci 5 mM. Tento roztok byl dostatečně stabilní a byl uchováván v lednici.

Příprava vzorku testované látky

Příslušnou testovanou látku vždy jsme rozpustili dle její molární hmotnosti v rozpouštědle dimethylsulfoxidu. Výchozí koncentrace testované látky se lišila, nejčastěji jsme však vycházeli z koncentrace 25 mM. Z tohoto roztoku jsme pomocí ředění dimethylsulfoxidem získali roztoky testovaných látek o potřebných nižších koncentracích.





6.7. Stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů

Pro získání kalibrační křivky měďnatých iontů jsme si nejprve museli připravit základní reagenční a pracovní roztoky. Poté jsme napipetovali příslušné jednotlivé látky o přesné koncentraci a v přesném pořadí do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Následně jsme pomocí spektrofotometru získali hodnoty absorbance. Sestrojili jsme kalibrační křivku a vyhodnotili závislost absorbance na použité koncentraci měďnatých iontů.

- Připravili jsme si základní reagenční a pracovní roztoky. Při tomto stanovení jsme potřebovali základní roztoky jako byl 5 mM roztok pentahydrátu síranu měďnatého, 10 mM roztok hydroxylamin hydrochloridu a 5 mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny. Dále jsme si připravili vodný roztok měďnatých iontů o koncentracích 50, 100, 150, 200 a 250 μ M.
- Do všech jednotlivých jamek mikrotitrační destičky jsme pipetovali 150 μ l pufru o pH 6.8.
- Stejně tak do všech jednotlivých jamek jsme přidali 1 mM roztok hydroxylamin hydrochloridu o objemu 50 μ l.
- Do testovacích jamek jsme pipetovali 50 μ l roztoku měďnatých iontů o příslušné koncentraci. Do kontrolních jamek mikrotitrační destičky jsme přidali 50 μ l destilované vody.
- Mikrotitrační destičku jsme umístili na třepačku pro mikrotitrační destičky a nechali ji třepat po dobu 1 minuty.
- Do testovacích jamek jsme jako indikátor následně přidali roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny o objemu 50 μ l. Do zbývajících jamek (kontrolní jamky) jsme pipetovali destilovanou vodu o stejném objemu 50 μ l. Viz. Obrázek 2.
- Po přidání všech potřebných složek, uvedených výše, jsme mikrotitrační destičku okamžitě umístili do spektrofotometru. Měřili jsme hodnotu absorbance při vlnové délce 484 nm.
- V čase 4 minuty 30 vteřin jsme opět měřili absorbanci (vlnovou délku jsme opět nastavili na 484 nm).

- Námi změřené hodnoty absorbance jsme zanesli do tabulky programu MS Excel a zjistili jsme hodnotu absorbance pro samostatný roztok měďnatých iontů (očištěno od hodnoty průměru absorbance slepých vzorků)
- Sestrojili jsme graf kalibrační křivky.

	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 0 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 50 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 100 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 150 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 200 μM	$c(\text{Cu}^{2+})$ = 250 μM
Jamky s indikátorem						
Slepé vzorky						

	Kontrolní jamky (bez měďnatých iontů)
	Testovací jamky (přidány měďnaté ionty o příslušné koncentraci)
	Jamky s indikátorem (přidán roztok BCS)
	Slepé vzorky (přidána destilovaná voda místo indikátoru)

Finální obsah jamky:

150 μl pufru
 50 μl roztok hydroxylamin hydrochloridu
 50 μl roztok Cu^{2+} nebo destilované vody
 50 μl roztok BCS nebo destilované vody





Obrázek 2: Znáznornění jamek mikrotitrační destičky u stanovení kalibrační křivky Cu^{2+} iontů

6.8. Metodický postup pro stanovení schopnosti redukce měďnatých iontů v pufru

Napipetovali jsme v tomto postupu používané jednotlivé látky o přesné koncentraci a v přesném pořadí do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky. Jako indikátor jsme použili 5 mM roztok disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny (mimo dolních dvou řad, kde byla přidána destilovaná voda jako slepý vzorek). V posledním sloupci jsme místo testované látky přidali příslušný roztok hydroxylamin hydrochloridu, který plnil úlohu pozitivní kontroly (jednalo se o redukční činidlo, které kompletně redukovalo měďnaté ionty na ionty měďné).

- V rámci tohoto postupu jsme použili již připravené zásobní a pracovní roztoky.
- Do všech jednotlivých jamek mikrotitrační destičky jsme pipetovali 100 μ l příslušného pufru o pH (4.5, 5.5, 6.5 a 7.5).
- Do testovacích jamek jsme přidali 50 μ l testované látky o příslušné koncentraci nebo rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO), který sloužil jako negativní kontrola. Do posledního sloupce jamek mikrotitrační destičky (kontrolní jamky) jsme přidali roztok hydroxylamin hydrochloridu (HA). Koncentrace HA se řídila dle hodnoty pH použitého pufru (1 mM HA při použitém pufru o pH 6.8 a 7.5 a koncentrace HA 10 mM u použitého pufru o pH 4.5 a 5.5).
- Poté jsme pipetovali do všech jednotlivých jamek mikrotitrační destičky 250 μ M roztok Cu^{2+} iontů o objemu 50 μ l.
- Mikrotitrační destičku jsme umístili na třepačku pro mikrotitrační destičky a nechali ji třepat po dobu 2 minut.
- Do horních dvou řad mikrotitrační destičky (jamky s indikátorem) jsme pipetovali 5 mM disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny o objemu 50 μ l. Do zbývajících dolních dvou řad mikrotitrační destičky (slepé vzorky) jsme přidali destilovanou vodu o stejném objemu 50 μ l. Viz. Obrázek 3.
- Po přidání všech potřebných složek, uvedených výše, jsme mikrotitrační destičku okamžitě umístili do spektrofotometru a měřili jsme hodnotu absorbance při vlnové délce 484 nm (tuto vlnovou délku jsme použili pro všechny námi stanovované pufrы o pH 4.5, 5.5, 6.5 a 7.5).
- V čase 4 minuty 30 vteřin jsme znovu měřili hodnotu absorbance (vlnovou délku jsme opět nastavili hodnotu na 484 nm).
- Námi změřené hodnoty absorbance jsme zanesli do tabulky, kde jsme díky statistické analýze získali stanovované hodnoty.
- Sestrojili jsme graf křivky.

	Roztok testované látky C ₁	Roztok testované látky C ₂	Roztok testované látky C _x	Rozpouštědlo (DMSO)	Kontrolní jamky (HA)
Jamky s indikátorem					
Slepé vzorky					

	Kontrolní jamky (přidán HA místo roztoku testované látky)
	Testovací jamky (přidány měďnaté ionty o příslušné koncentraci)
	Jamky s indikátorem (přidán roztok BCS)
	Slepé vzorky (přidána destilovaná voda místo indikátoru)

Finální obsah jamky:

100 µl pufru
50 µl roztok testované látky/ DMSO/ HA
50 µl roztok Cu²⁺
50 µl roztok BCS nebo destilované vody

Obrázek 3: Znáznornění jamek mikrotitrační destičky u stanovení redukce Cu²⁺ iontů

6.9. Statistická analýza

Pro statistickou analýzu jsme použili program Microsoft Excel 2010, Microsoft Excel 2013 a GraphPad Prism verze 6 pro Windows (GraphPad Software, USA). Pro porovnání redukčních maxim u jednotlivých testovaných látek jsme využili Tukey test mnohonásobného porovnávání. Naměřené výsledky jsme zpracovali a následně znázornili jako průměr ± hodnota směrodatné

odchylky, která byla vypočítána dle vzorce $\sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}}$.

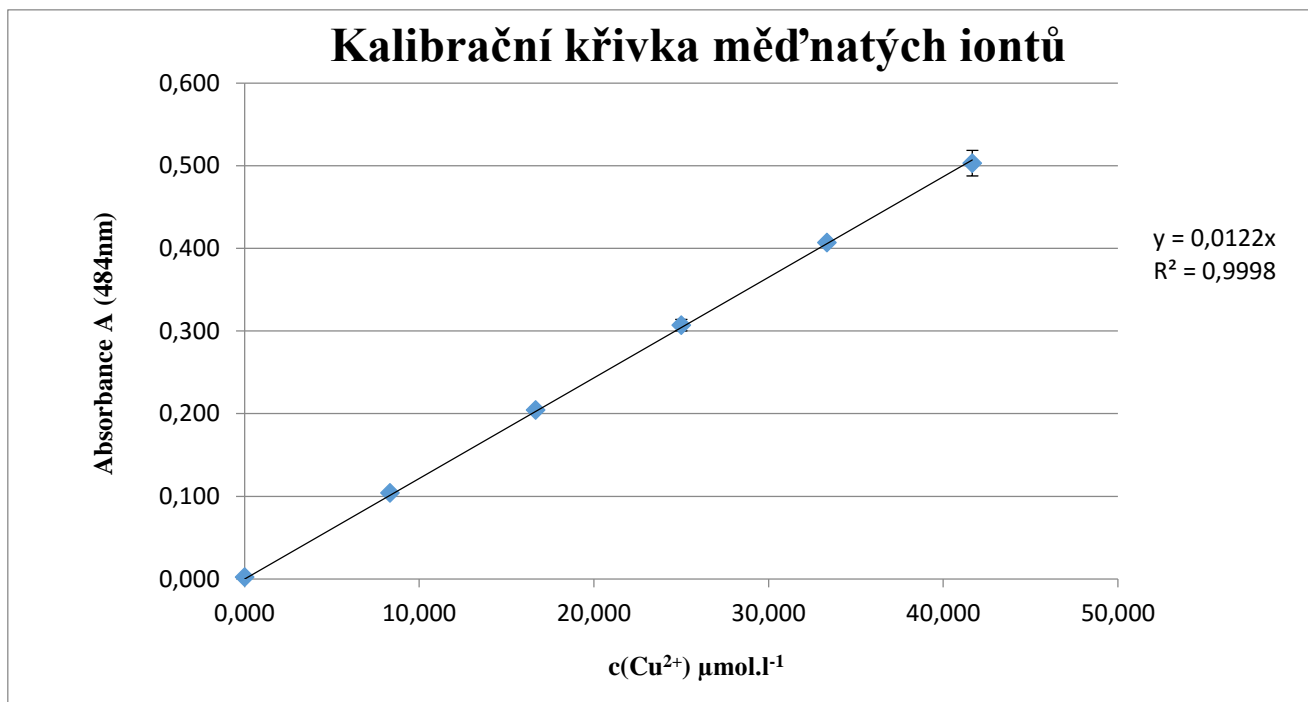
7. Výsledky

7.1. Stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů

Dle stanoveného postupu pro stanovení kalibrační křivky měďnatých iontů jsme získali hodnoty absorbance. Pracovali jsme s koncentracemi měďnatých iontů 50 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM a 250 μM (Tabulka 3). Následně jsme sestrojili graf kalibrační křivky (Obrázek 4), ze kterého bylo patrné, že se zvyšující se hodnotou koncentrace roztoku měďnatých iontů se zvyšovala i hodnota naměřené absorbance. Hodnota absorbance byla lineárně závislá na koncentraci roztoku měďnatých iontů.

Základní koncentrace měďnatých iontů (μM)	0	50	100	150	200	250
Finální koncentrace měďnatých iontů (μM)	0	8,33	16,67	25,00	33,33	41,67
Průměr absorbance (A)	0,00	0,10	0,20	0,31	0,41	0,50

Tabulka 3: Výsledky pro sestavení kalibrační křivky Cu^{2+} iontů



Obrázek 4: Kalibrační křivka měďnatých iontů

7.2. Měď redukující účinky testovaných metabolitů kvercetinu

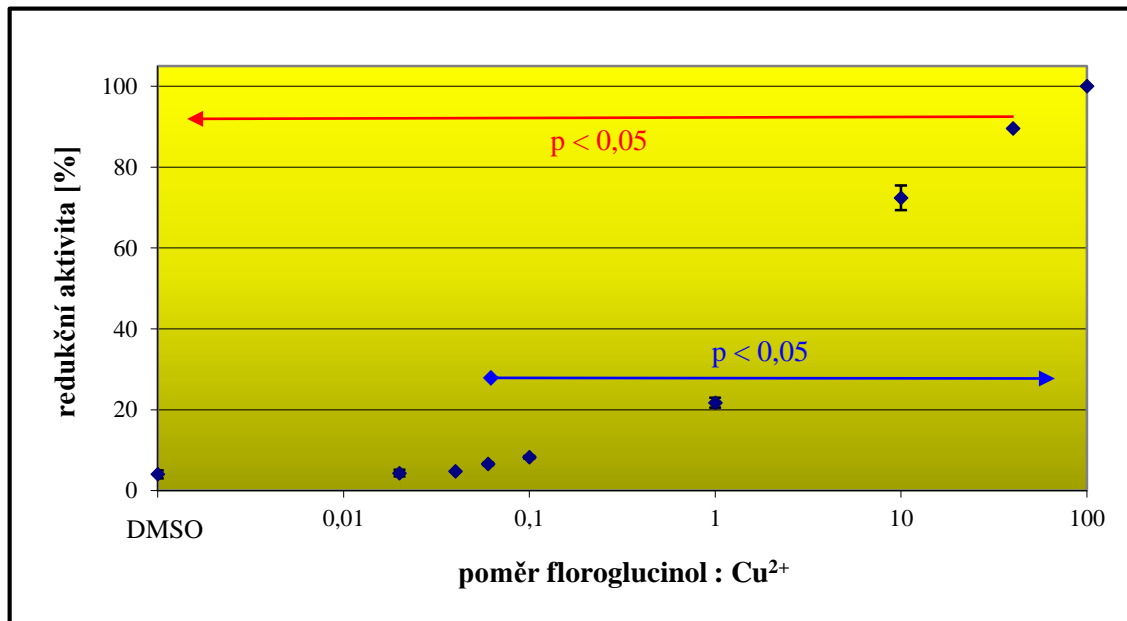
Zkoumali jsme schopnost jednotlivých metabolitů kvercetinu *in vitro* redukovat měďnaté ionty na ionty měďné při různých koncentracích testované látky a ve čtyřech různých pufrch. Právě tyto čtyři různá prostředí měla simulovat (pato)fyzilogické podmínky v lidském organismu. U vybraných metabolitů kvercetinu jsme pomocí spektrofotometru získali hodnoty absorbance, údaje jsme pak převedli do grafů a díky tomu jsme získali povědomí o jejich schopnosti redukce. Testovali jsme osm látek. Jednotlivé grafy zobrazují testované látky ve vztahu k jejich měď redukujícím účinkům při čtyřech různých hodnotách pH (4.5, 5.5, 6.5 a 7.5). Jednalo se o floroglucinol (Obr. 5, 6, 7, 8), 3- hydroxybenzoovou kyselinu (Obr. 11, 12, 13, 14), 3- hydroxyfenyloctovou kyselinu (Obr. 17, 18, 19, 20), 3, 4- dihydroxyfenyloctovou kyselinu (Obr. 47, 48, 49, 50), 4- methylcatechol (Obr. 23, 24, 25, 26), homovanilovou kyselinu (Obr. 29, 30, 31, 32), 3- kumarovou kyselinu (Obr. 35, 36, 37, 38) a 3- hydroxyfenylpropionovou kyselinu (Obr. 41, 42, 43, 44). Červené šipky v grafu signalizují statisticky významné hodnoty oproti redukčnímu maximu. Naopak modré šipky ukazují na statisticky významné hodnoty oproti rozpouštědлу dimethylsulfoxidu, které bylo použito jako negativní kontrola.

Následně jsou u testovaných látek uvedeny grafy maximální dosažené hodnoty redukční aktivity v jednotlivých testovaných prostředích (Obr. 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45 a 51). Dále jsou u testovaných látek vyobrazeny grafy, které ukazují koncentrační poměry testovaných látek vůči koncentraci testovaných měďnatých iontů při dosažení redukčního maxima (Obr. 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46 a 52). Červený kříž pak symbolizuje koncentrační poměr při maximální redukční aktivitě v daném prostředí, černé úsečky znázorňují koncentrační poměr, který se statisticky významně stále ještě nachází v oblasti redukčního maxima.

Dále jsou uvedeny souhrnné grafy pro celé prostředí, které srovnávají maximální dosaženou redukční aktivitu testovaných látek v konkrétním jednotlivém pH (Obr. 53, 55, 57, 59). Hvězdička v grafu znázorňuje statistickou pravděpodobnost větší než 99, 9%, kdy testovaná látka významně redukuje měďnaté ionty oproti rozpouštědлу DMSO. Poté jsou uvedeny grafy s koncentračními poměry testovaných látek, při kterých bylo dosaženo maxima redukce mědi (Obr. 54, 56, 58, 60). Tukey test mnohonásobného porovnávání srovnává schopnost redukce mědi v rámci jednotlivých testovaných metabolitů kvercetinu (Tab. 4, 5, 6, 7).

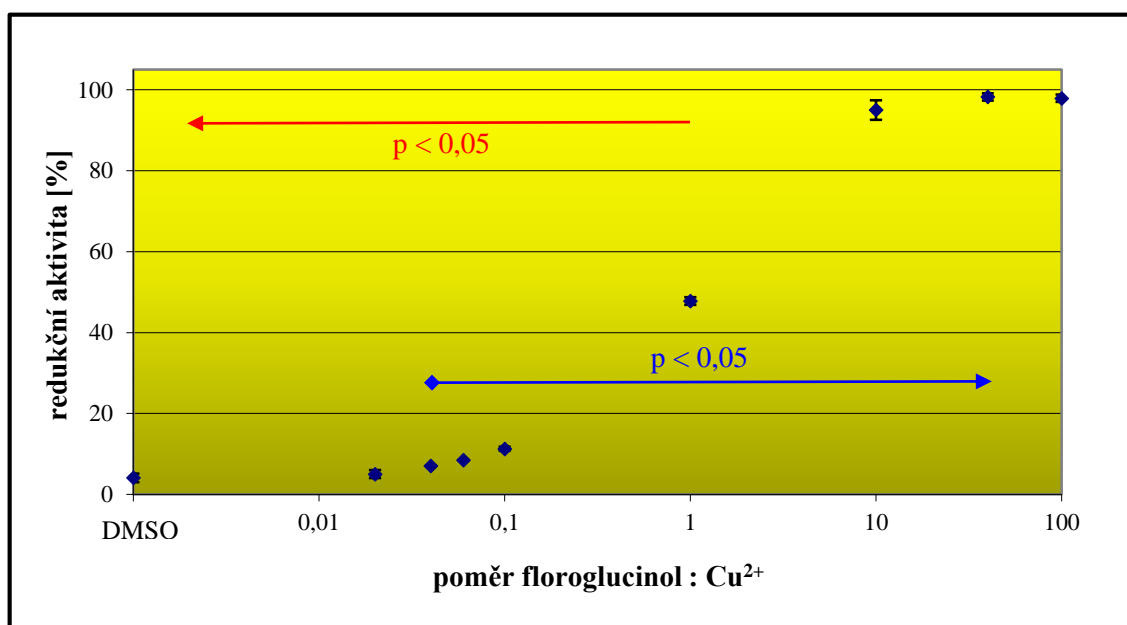
7.2.1. Měď redukující účinky floroglucinolu

pH 4,5



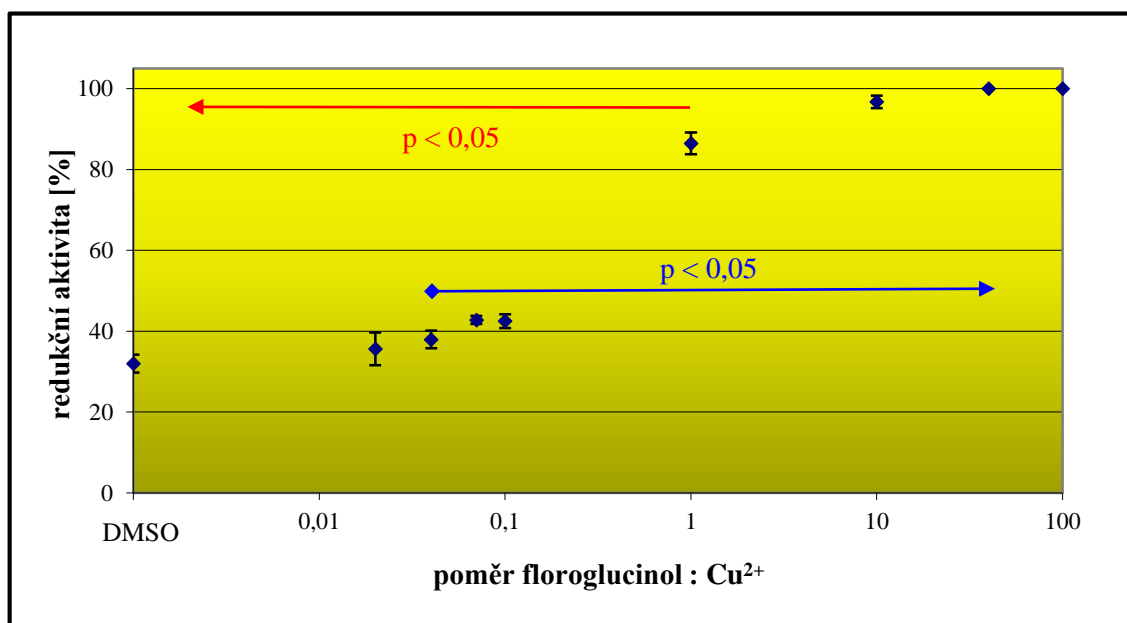
Obrázek 5: Měď redukující účinky floroglucinolu při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



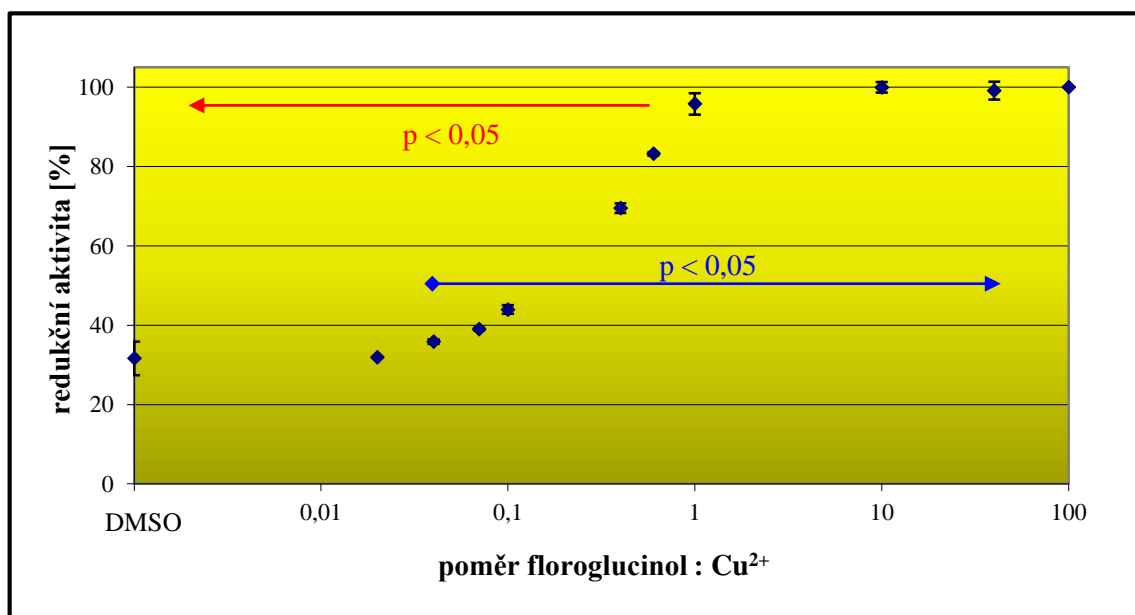
Obrázek 6: Měď redukující účinky floroglucinolu při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



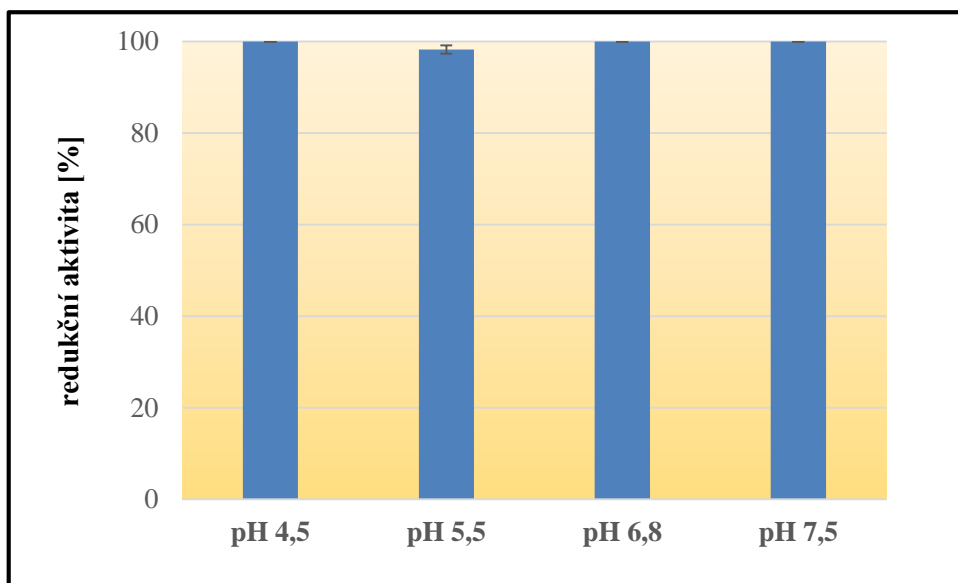
Obrázek 7: Měď redukující účinky floroglucinolu při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



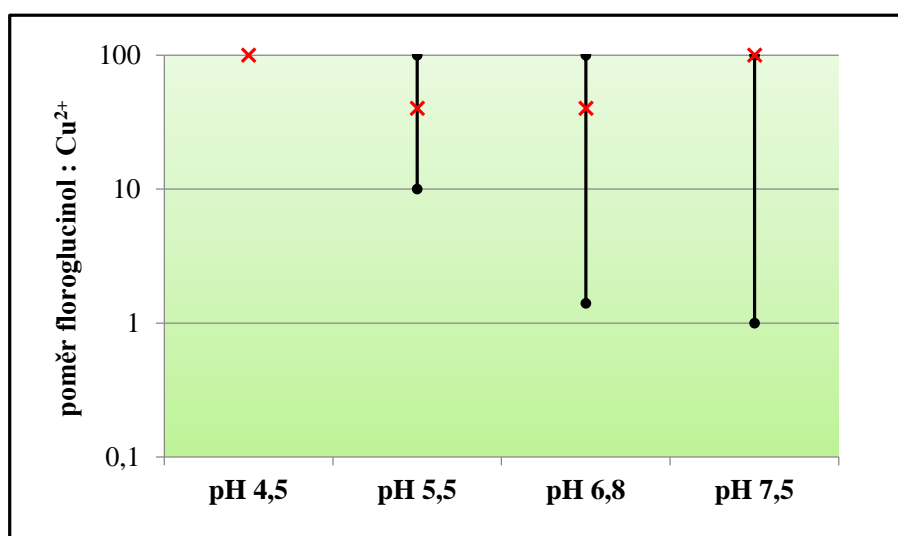
Obrázek 8: Měď redukující účinky floroglucinolu při pH 7.5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky floroglucinolu



Obrázek 9: Maximální měď redukující účinky floroglucinolu v prostředí o různém pH

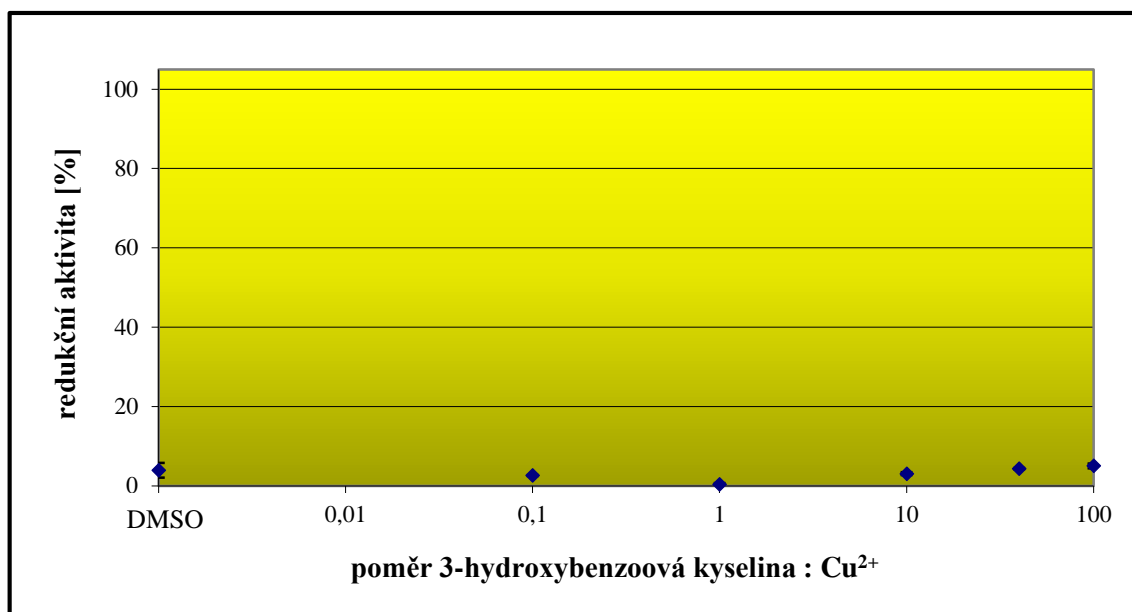
Poměr koncentrací floroglucinolu a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 10: Poměr koncentrací floroglucinolu a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH

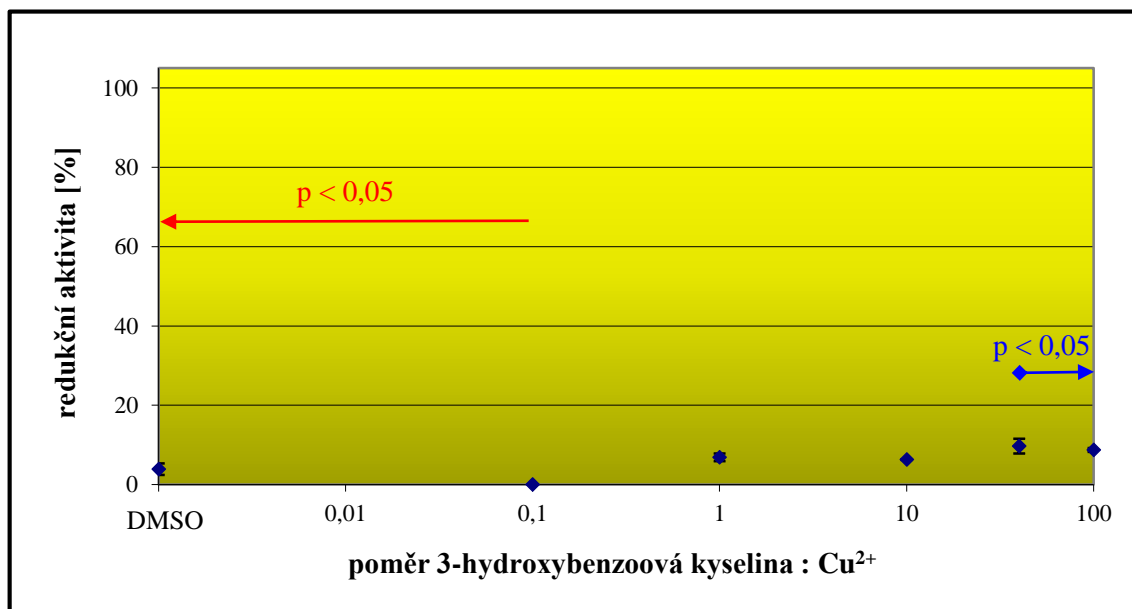
7.2.2. Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxybenzoové

pH 4,5



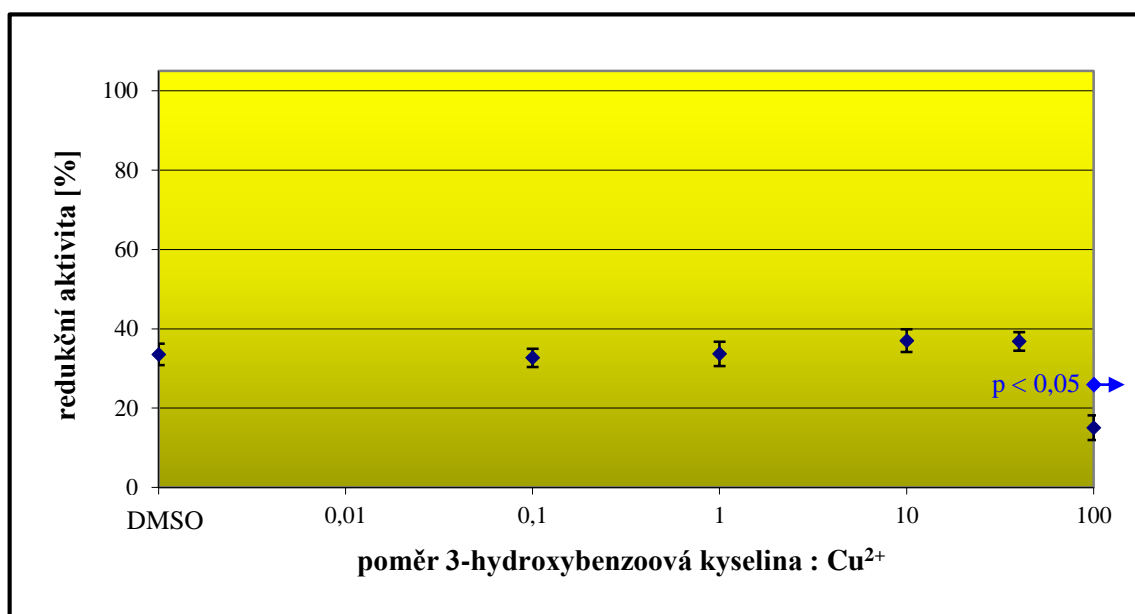
Obrázek 11: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxybenzoové při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



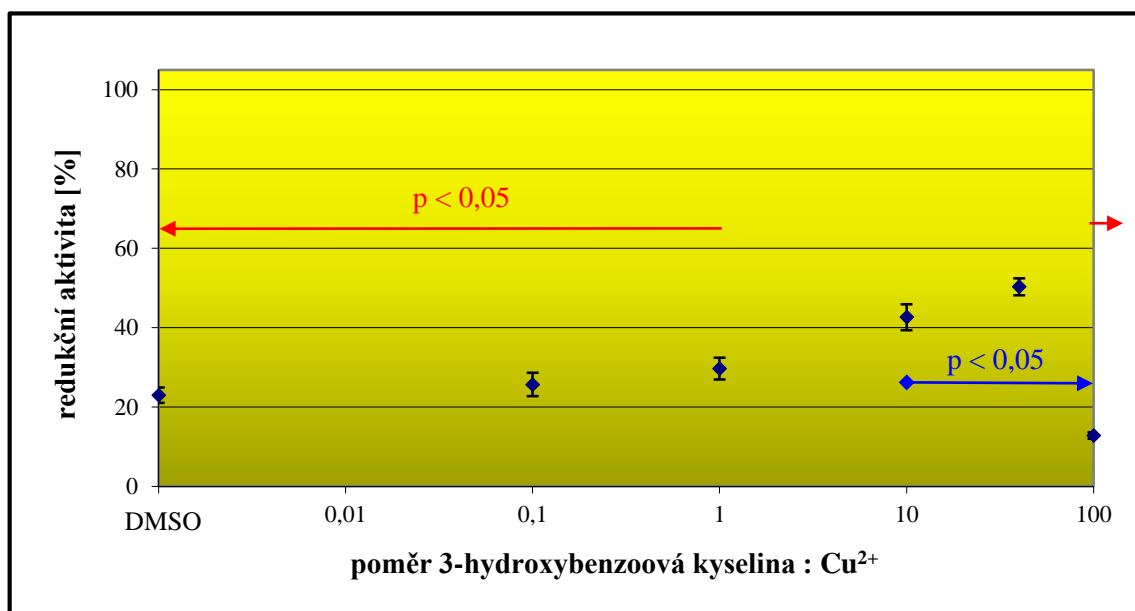
Obrázek 12: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxybenzoové při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



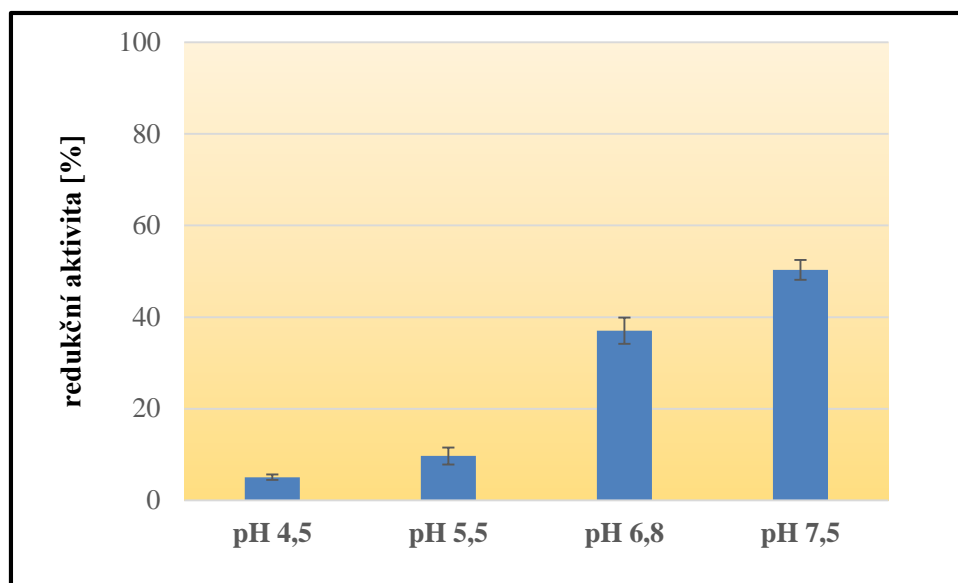
Obrázek 13: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxybenzoové při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



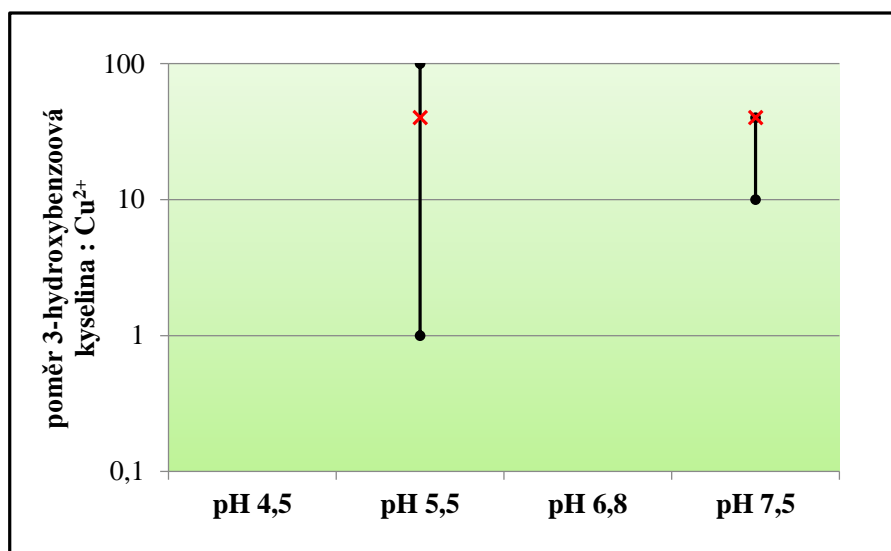
Obrázek 14: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxybenzoové při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky 3- hydroxybenzoové kyseliny



Obrázek 15: Maximální měď redukující účinky 3- hydroxybenzoové kyseliny v prostředí o různém pH

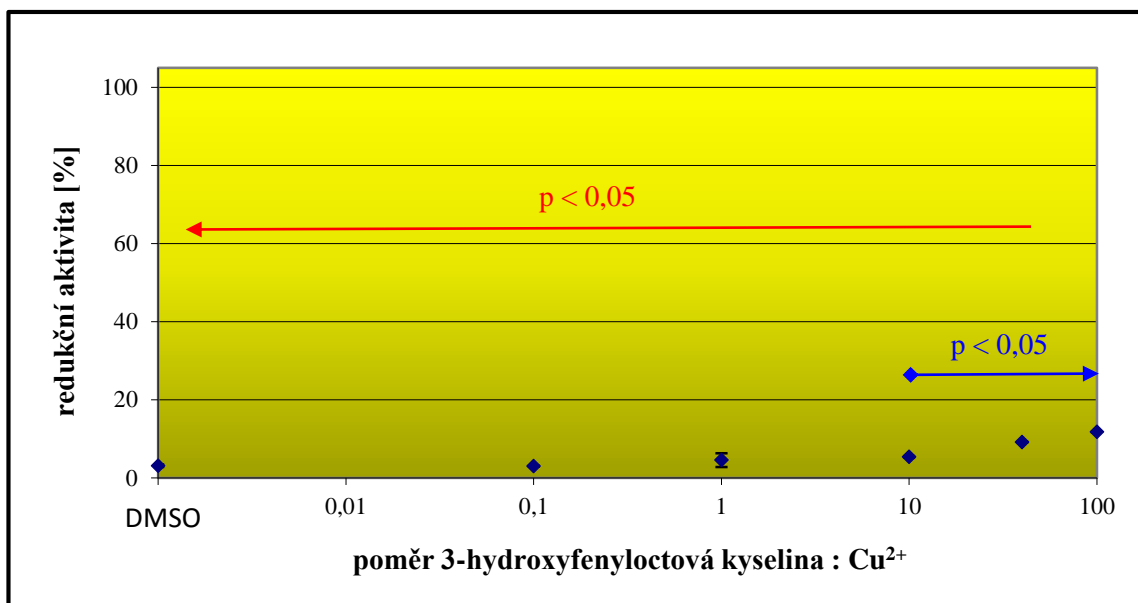
Poměr koncentrací 3- hydroxybenzoové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 16: Poměr koncentrací 3- hydroxybenzoové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH. Při pH 4.5 nebylo nalezeno žádné maximum až do poměru 100:1 kyselina 3- hydroxybenzoová: měďnaté ionty. Při tomto poměru v prostředí o pH 6,8 pak hodnota redukce ještě klesla oproti samotnému rozpouštědлу.

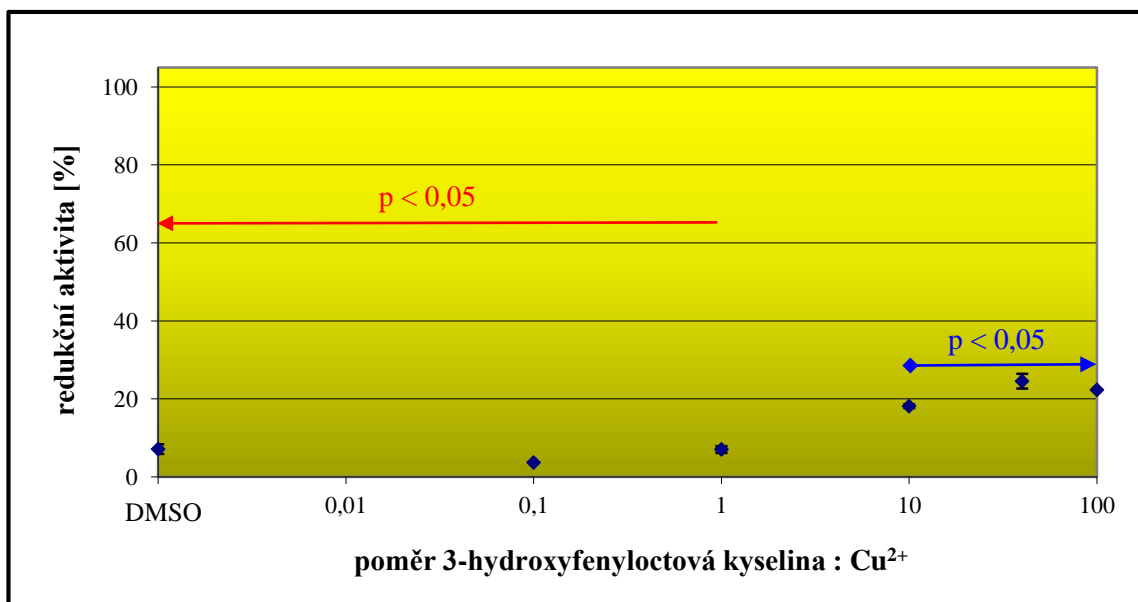
7.2.3. Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenyloctové

pH 4,5



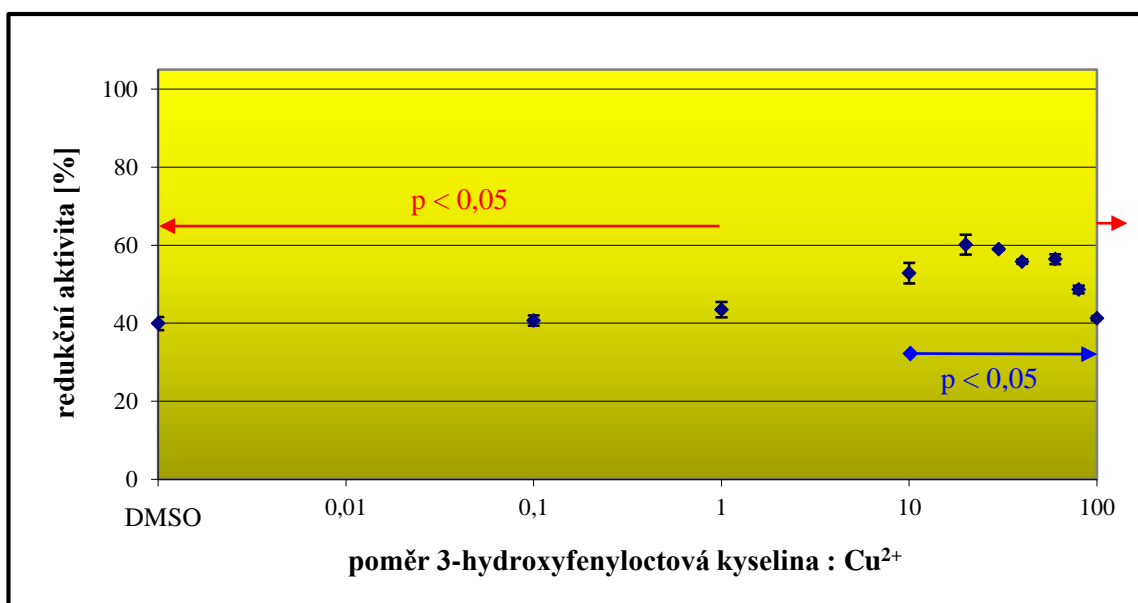
Obrázek 17: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenyloctové při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



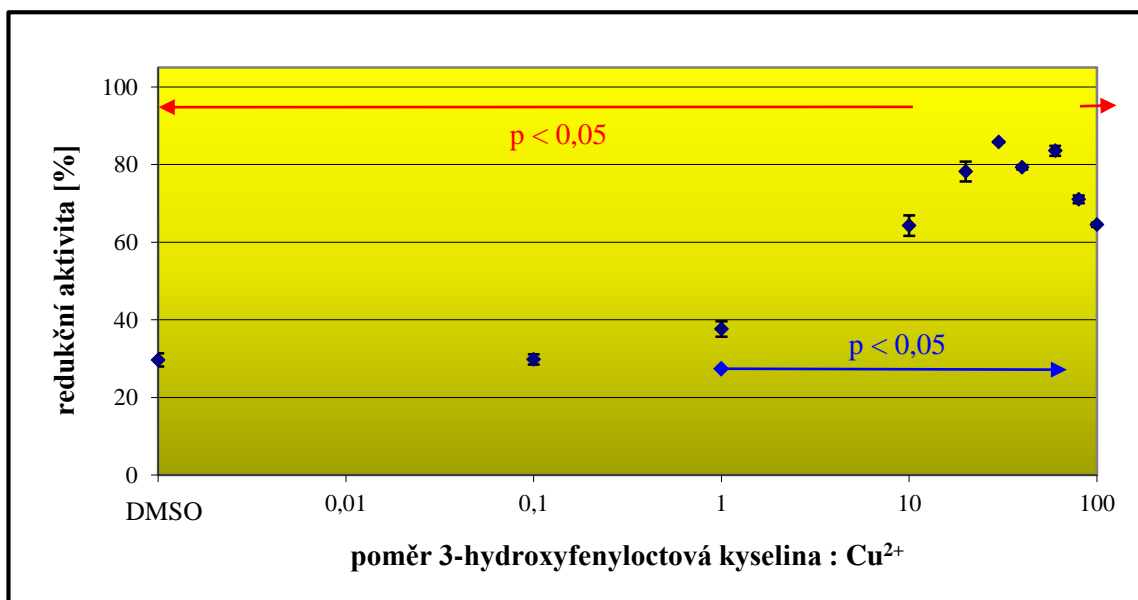
Obrázek 18: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenyloctové při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



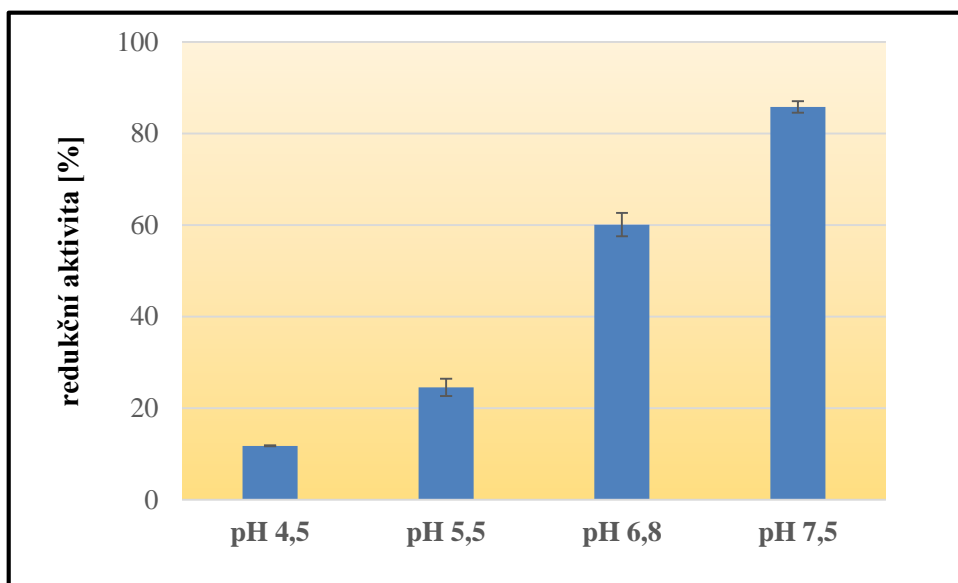
Obrázek 19: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenyloctové při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



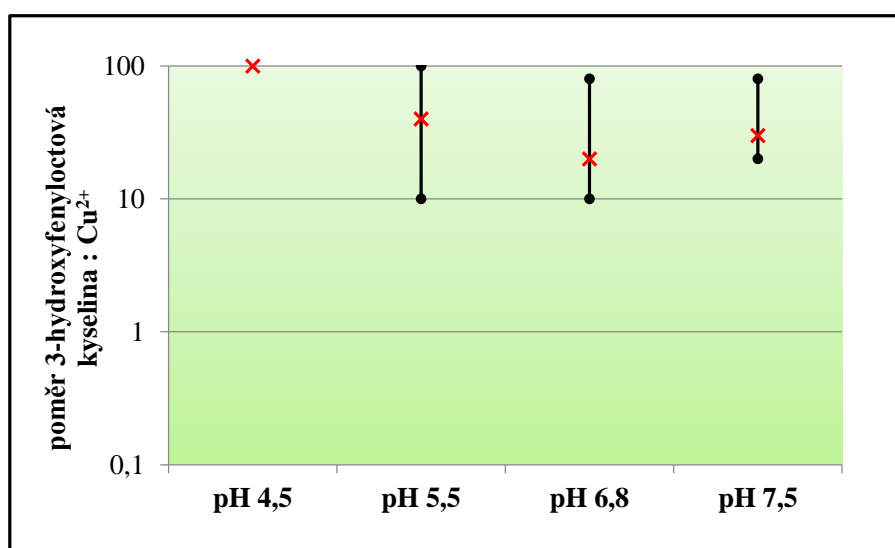
Obrázek 20: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenyloctové při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky 3- hydroxyfenyloctové kyseliny



Obrázek 21: Maximální měď redukující účinky 3- hydroxyfenyloctové kyseliny v prostředí o různém pH

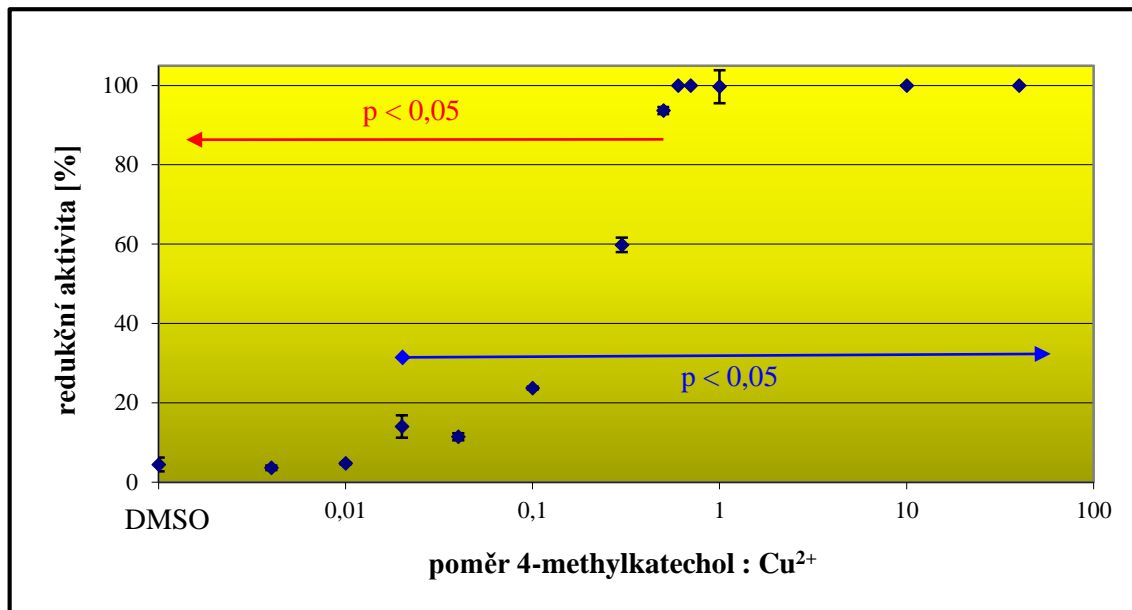
Poměr koncentrací 3- hydroxyfenyloctové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 22: Poměr koncentrací 3- hydroxyfenyloctové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH

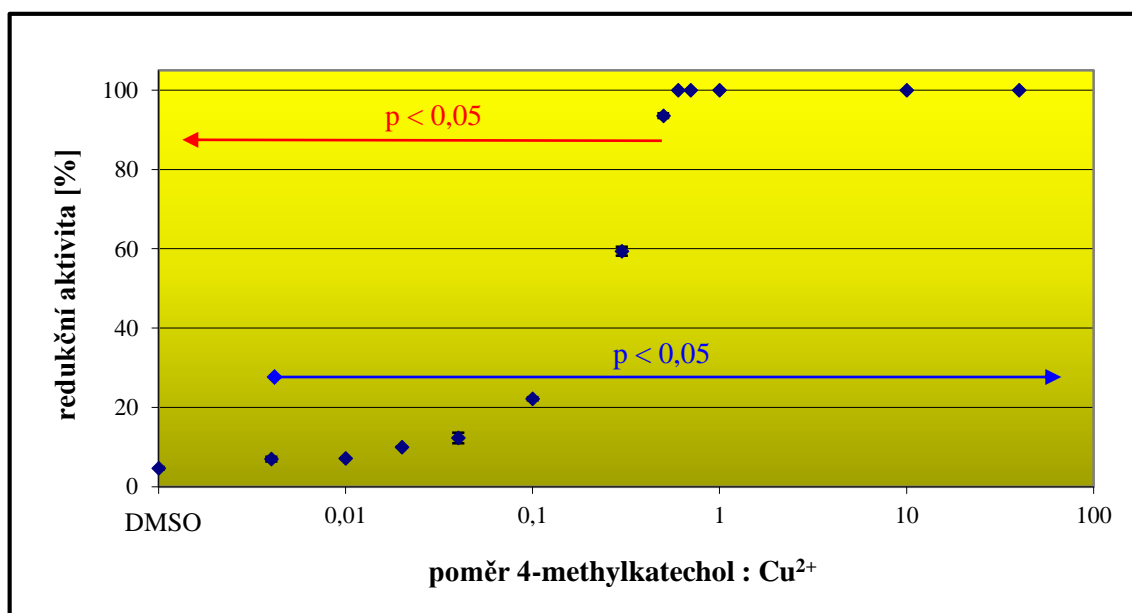
7.2.4. Měď redukující účinky 4- methylkatecholu

pH 4,5



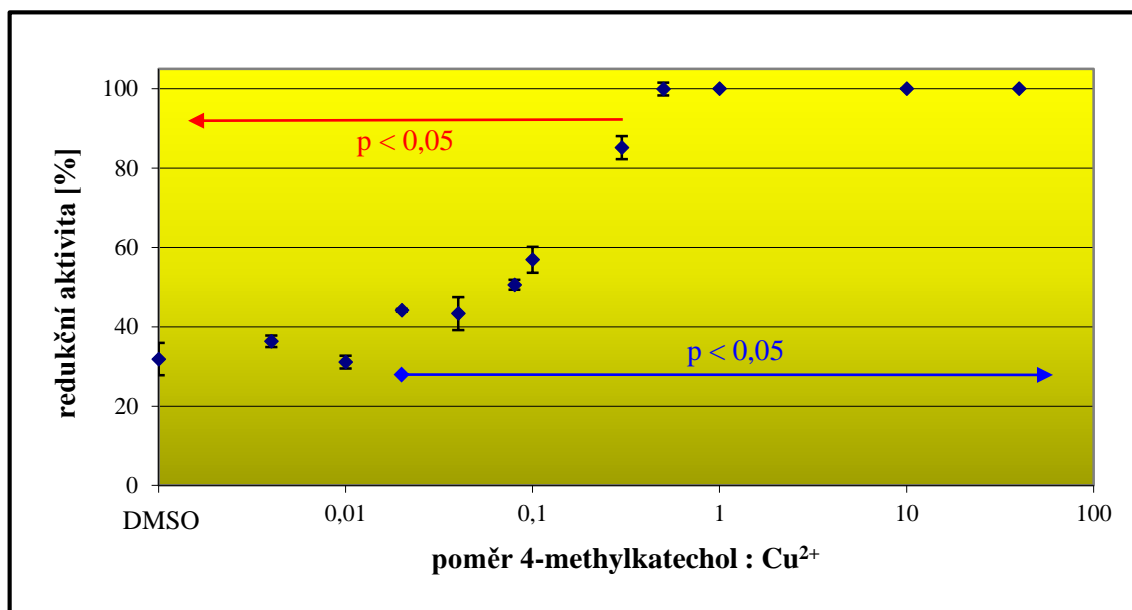
Obrázek 23: Měď redukující účinky 4- methylkatecholu při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



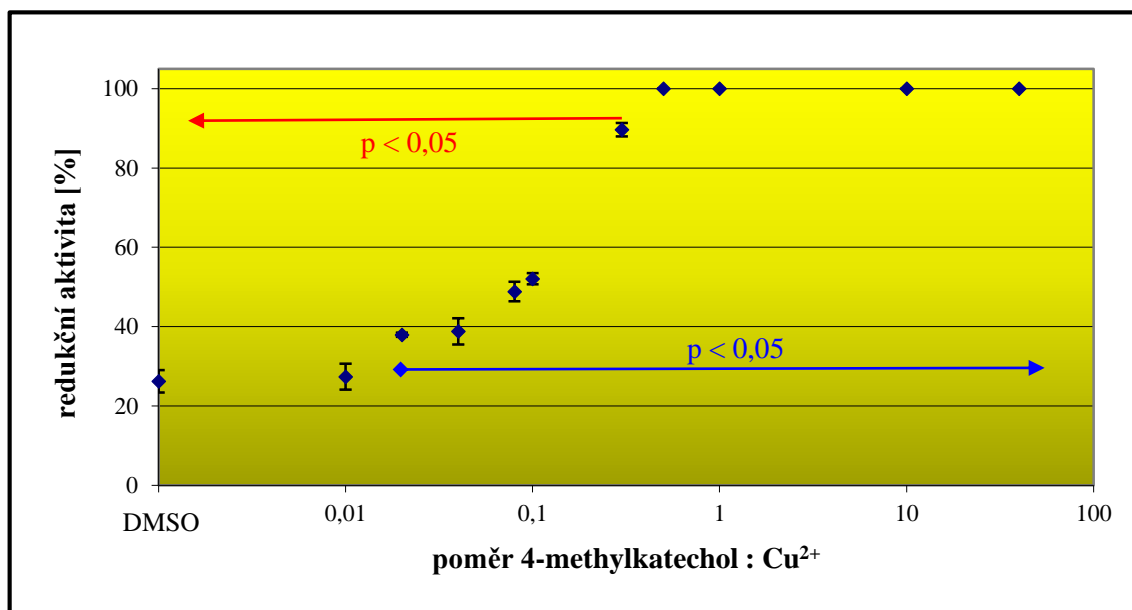
Obrázek 24: Měď redukující účinky 4- methylkatecholu při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



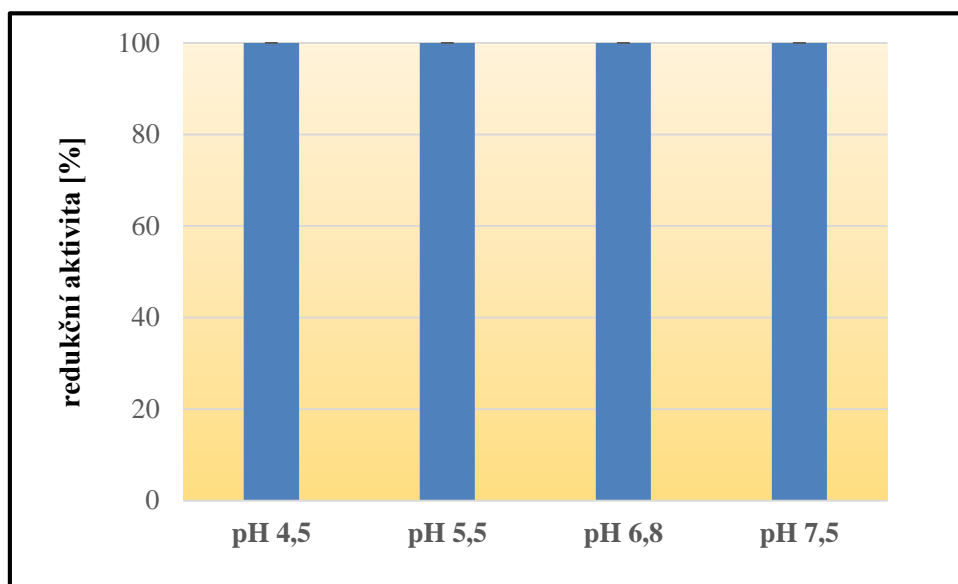
Obrázek 25: Měď redukující účinky 4- methylcatecholu při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



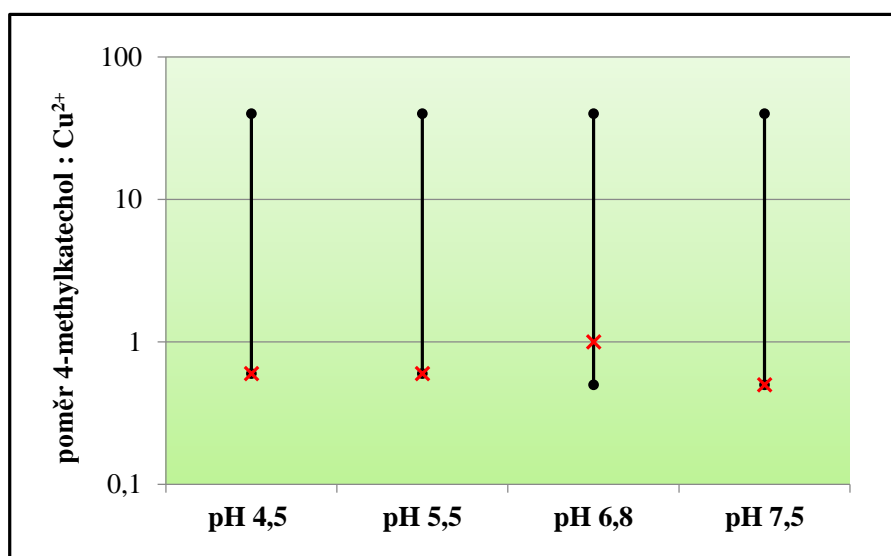
Obrázek 26: Měď redukující účinky 4- methylcatecholu při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky 4- methylkatecholu



Obrázek 27: Maximální měď redukující účinky 4- methylkatecholu v prostředí o různém pH

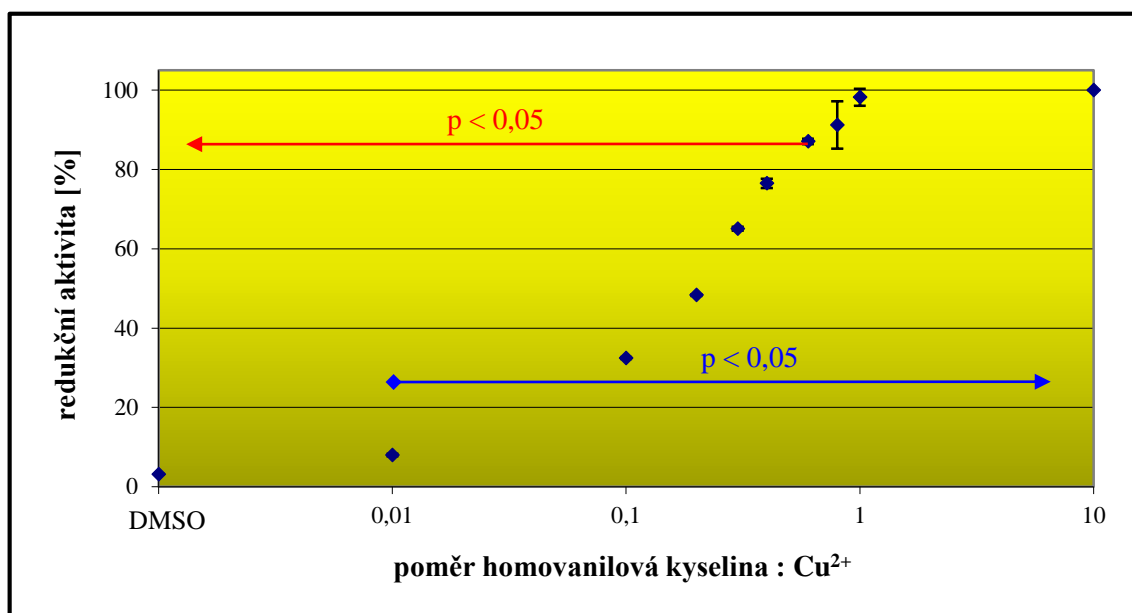
Poměr koncentrací 4- methylkatecholu a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 28: Poměr koncentrací 4- methylkatecholu a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH

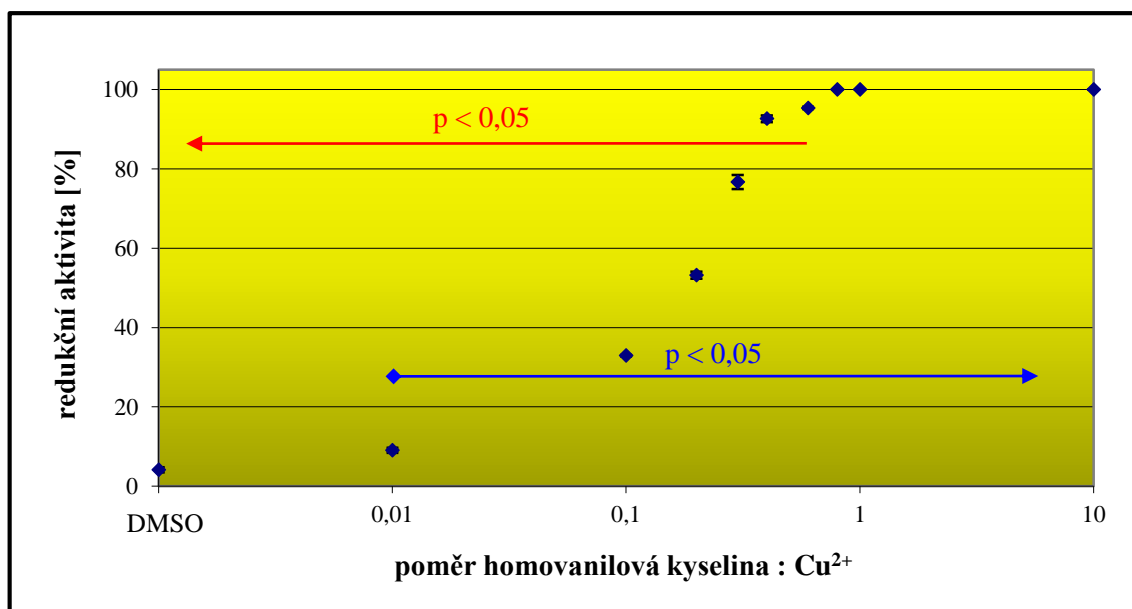
7.2.5. Měď redukující účinky homovanilové kyseliny

pH 4,5



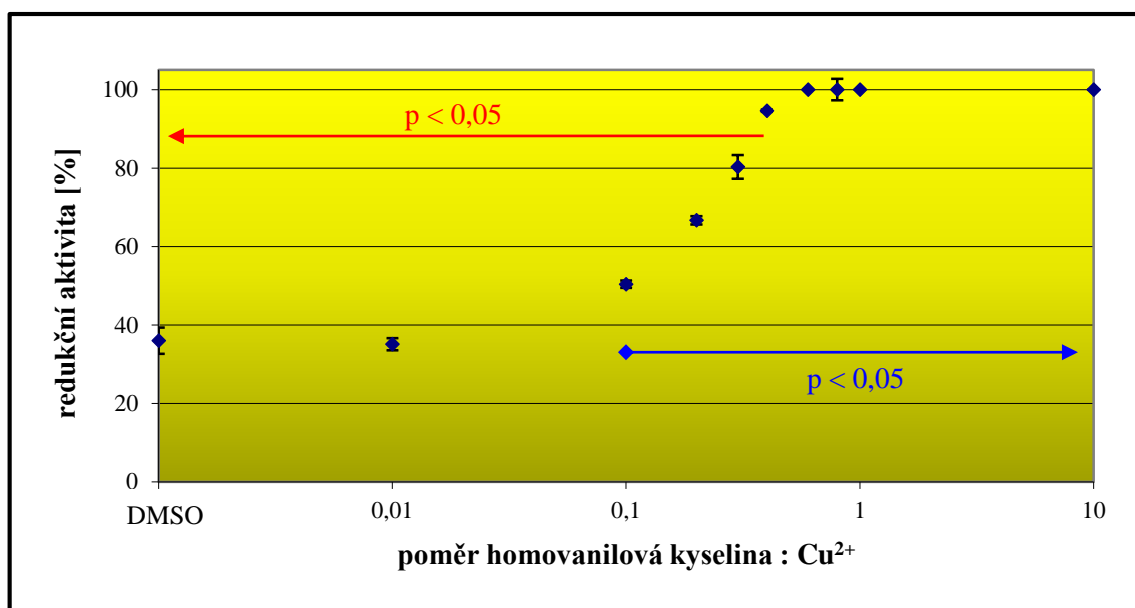
Obrázek 29: Měď redukující účinky kyseliny homovanilové při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



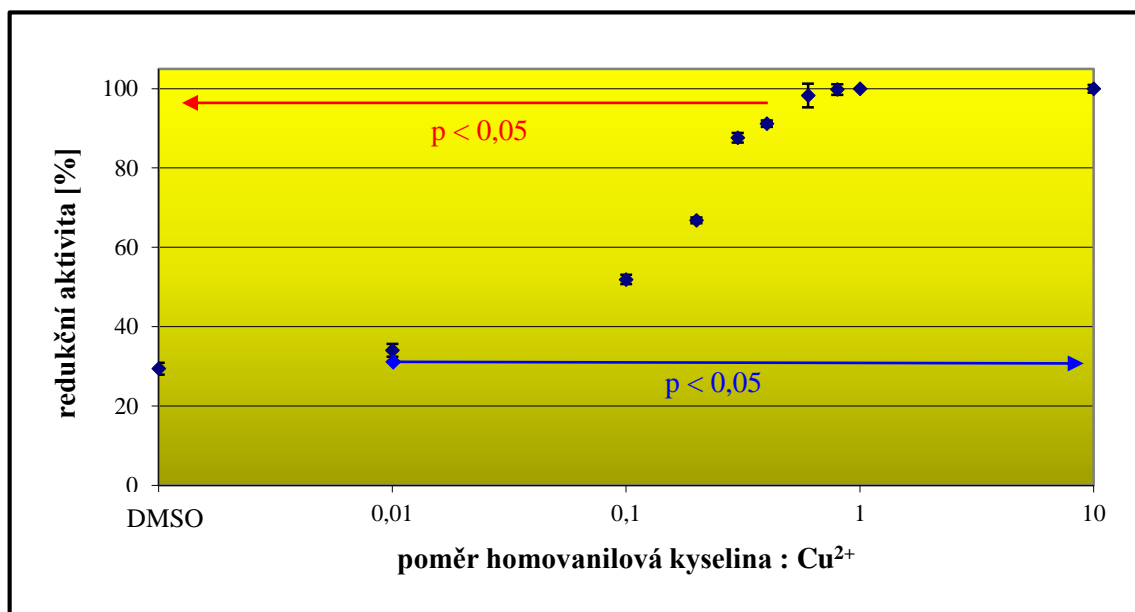
Obrázek 30: Měď redukující účinky kyseliny homovanilové při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



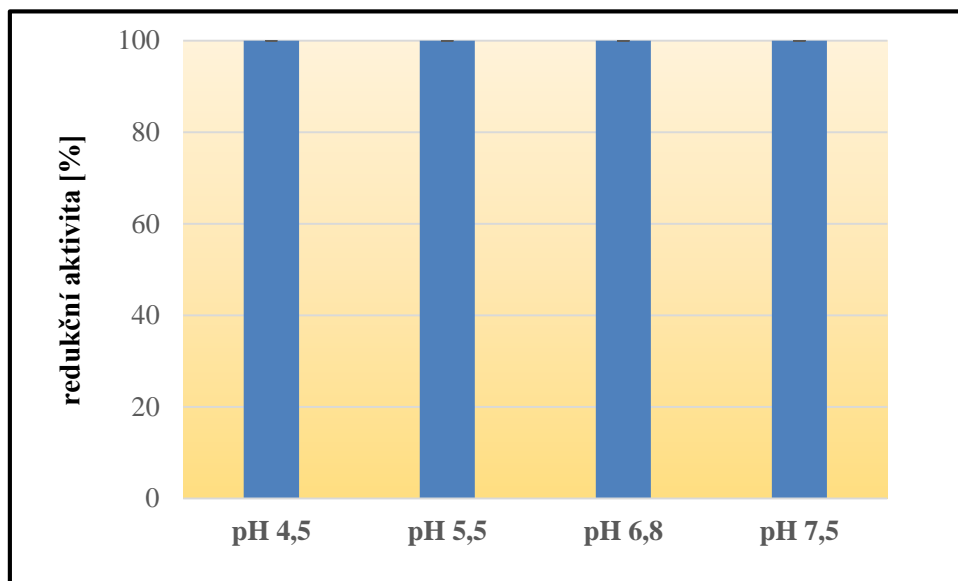
Obrázek 31: Měď redukující účinky kyseliny homovanilové při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



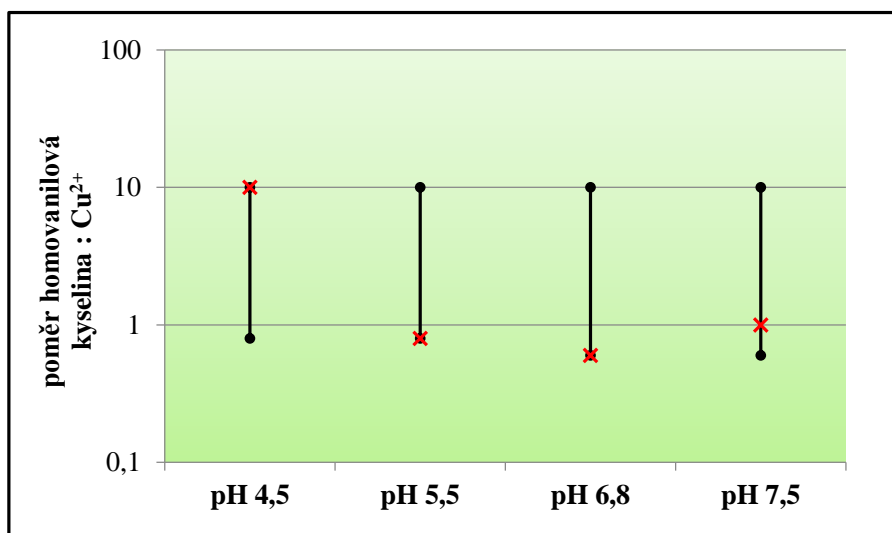
Obrázek 32: Měď redukující účinky kyseliny homovanilové při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky homovanilové kyseliny



Obrázek 33: Maximální měď redukující účinky homovanilové kyseliny v prostředí o různém pH

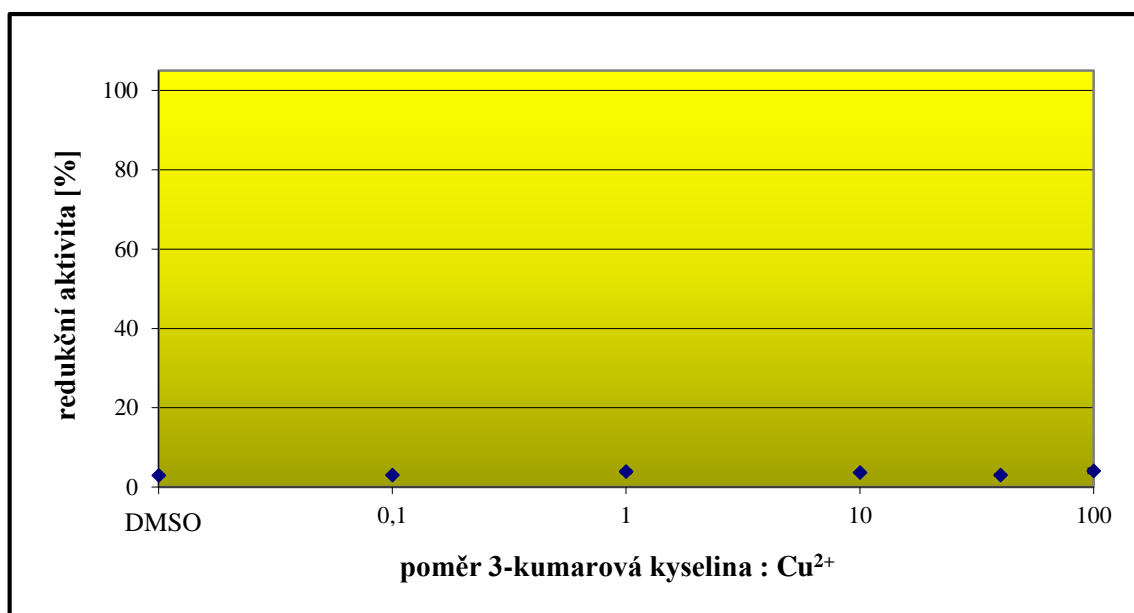
Poměr koncentrací homovanilové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 34: Poměr koncentrací homovanilové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH

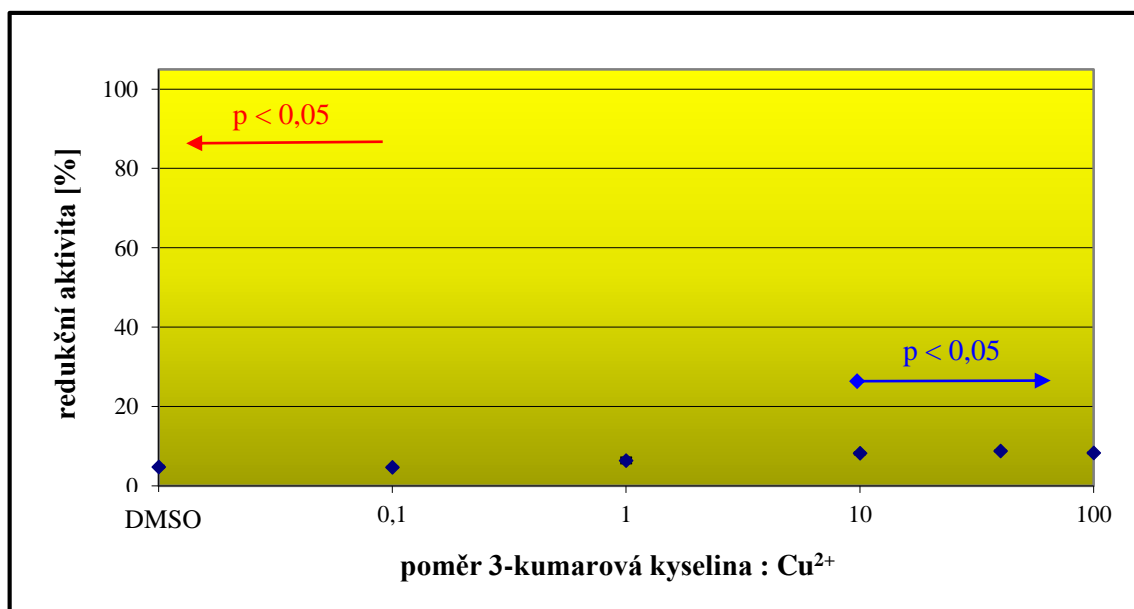
7.2.6. Měď redukující účinky 3- kumarové kyseliny

pH 4,5



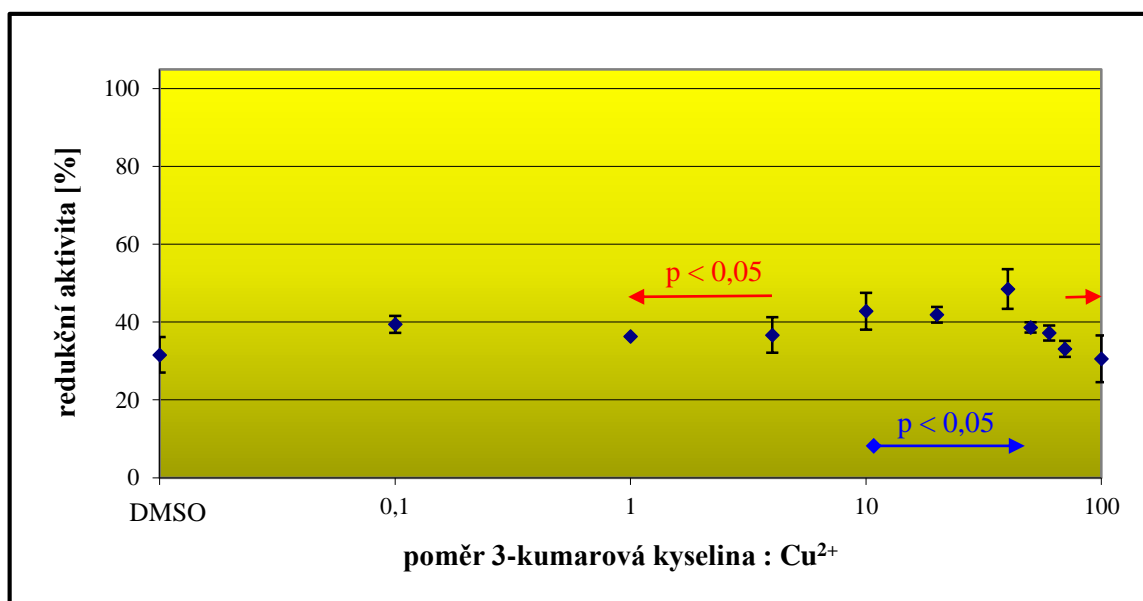
Obrázek 35: Měď redukující účinky kyseliny 3- kumarové při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



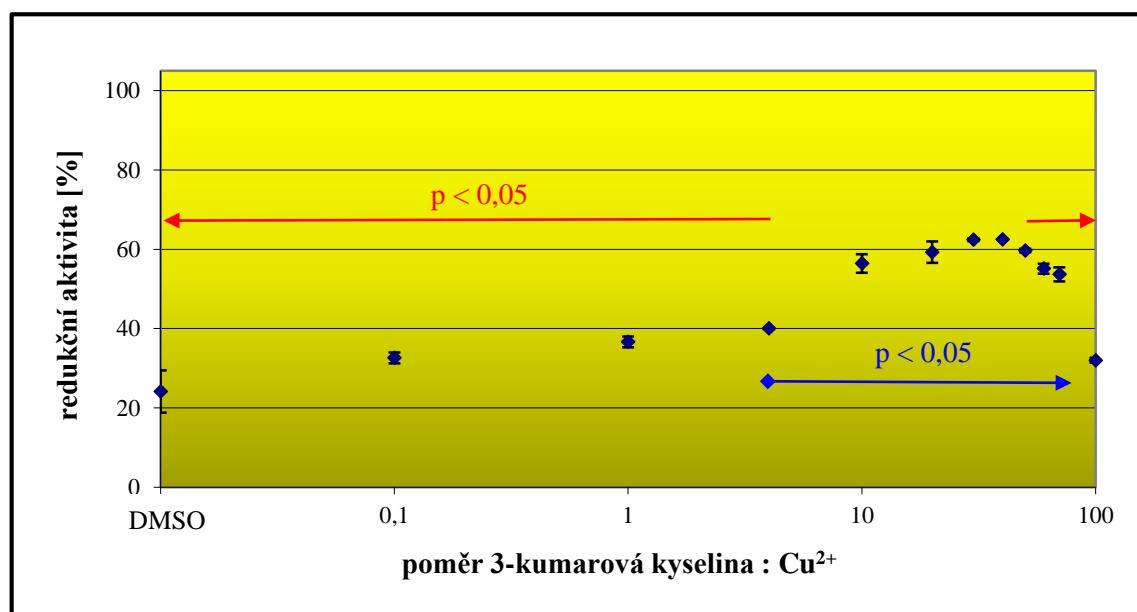
Obrázek 36: Měď redukující účinky kyseliny 3- kumarové při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



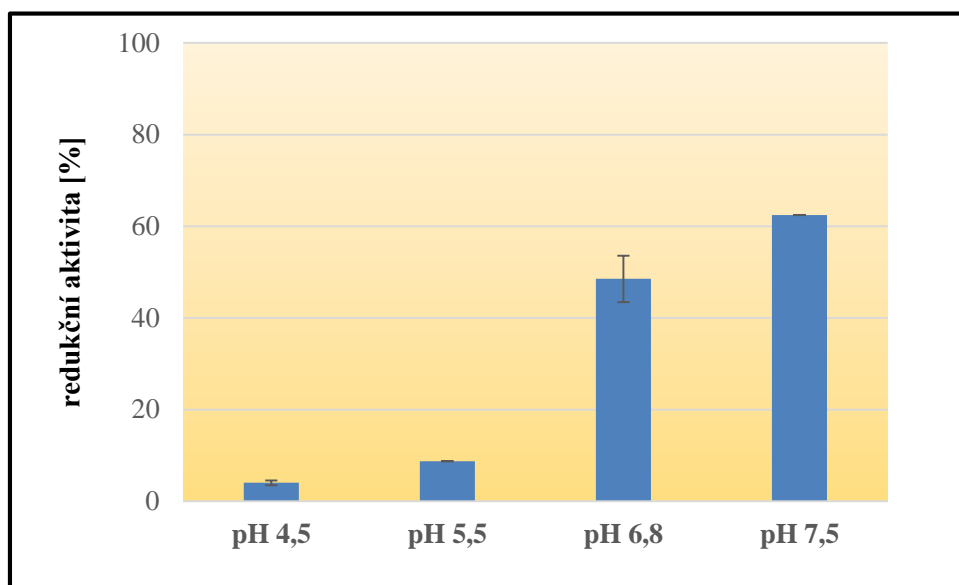
Obrázek 37: Měď redukující účinky kyseliny 3- kumarové při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



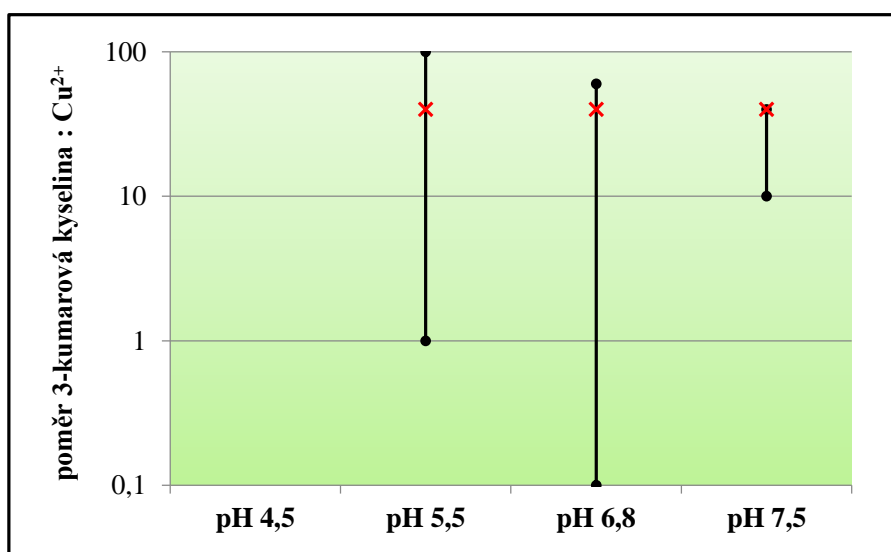
Obrázek 38: Měď redukující účinky kyseliny 3- kumarové při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky 3- kumarové kyseliny



Obrázek 39: Maximální měď redukující účinky 3- kumarové kyseliny v prostředí o různém pH

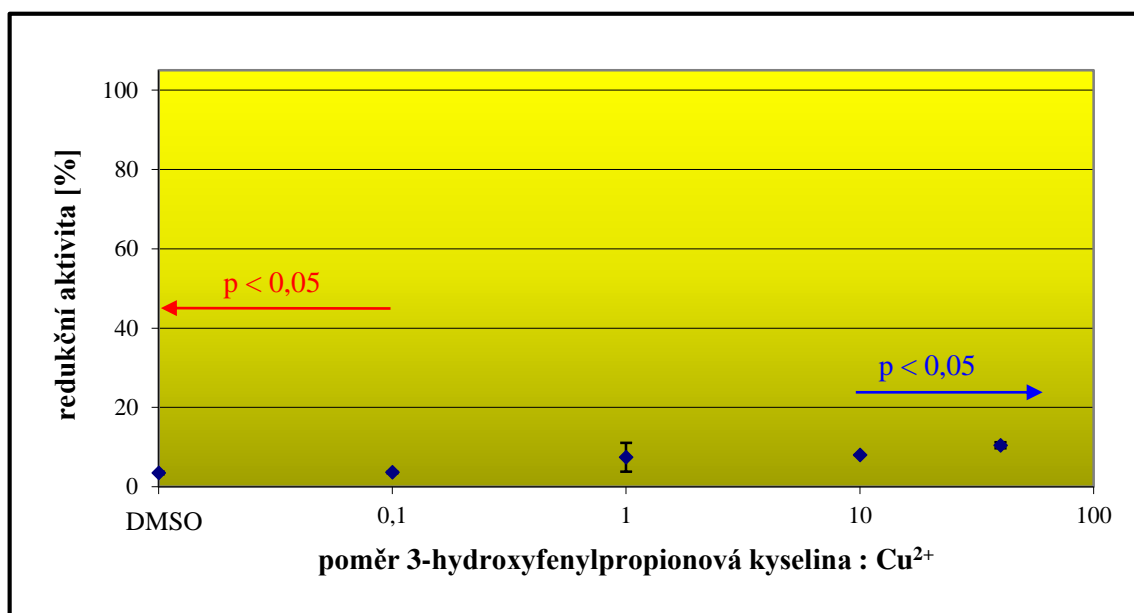
Poměr koncentrací 3- kumarové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 40: Poměr koncentrací 3- kumarové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH. Při pH 4.5 testovaná látka měďnaté ionty neredukovala.

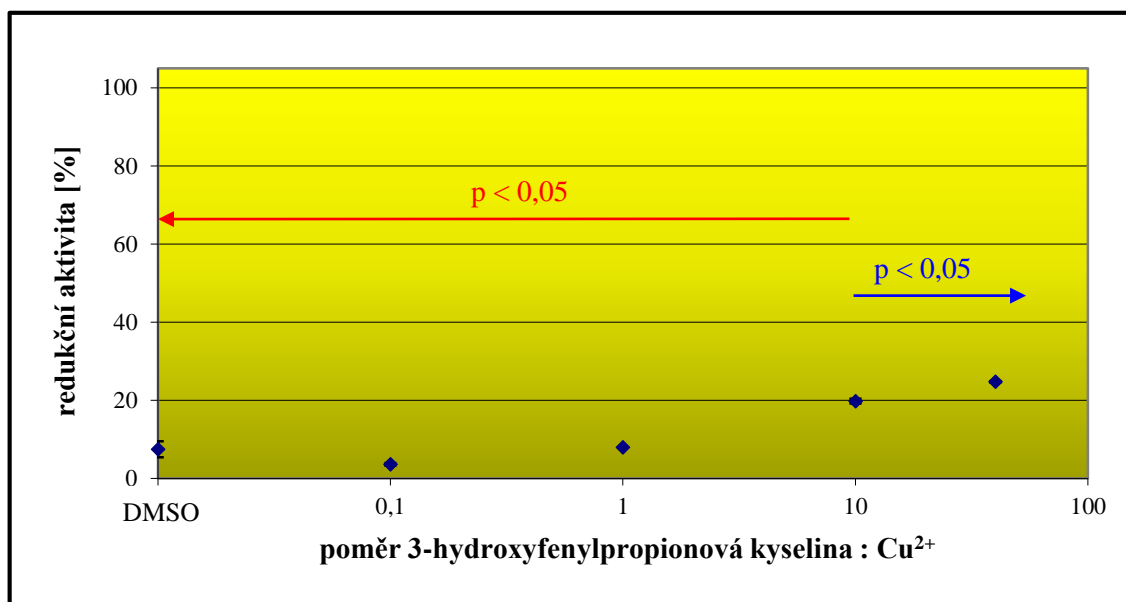
7.2.7. Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenylpropionové

pH 4,5



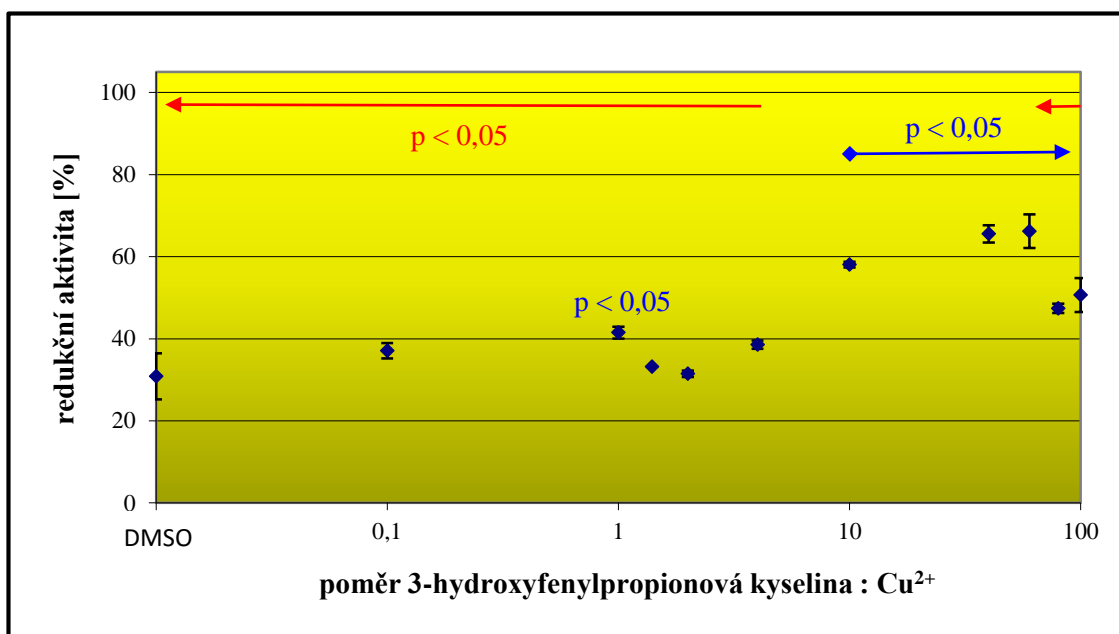
Obrázek 41: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenylpropionové při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



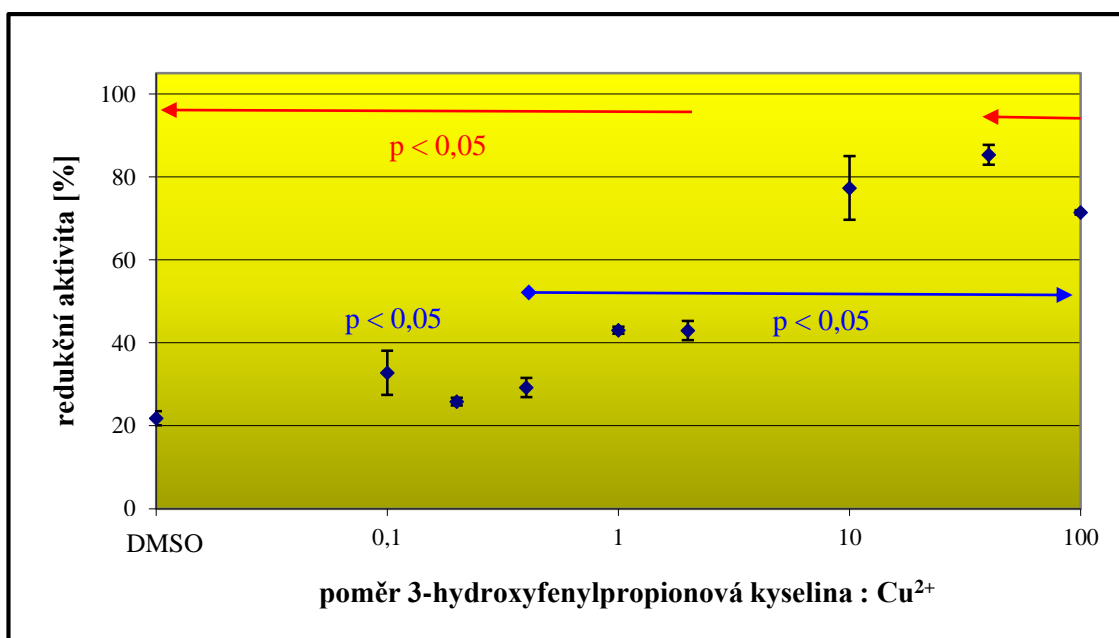
Obrázek 42: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenylpropionové při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



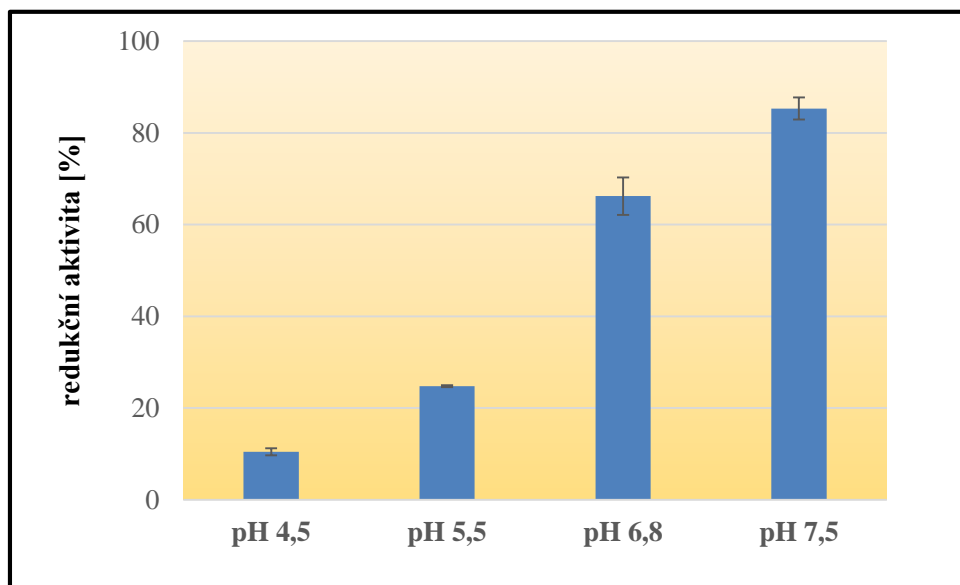
Obrázek 43: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenylpropionové při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



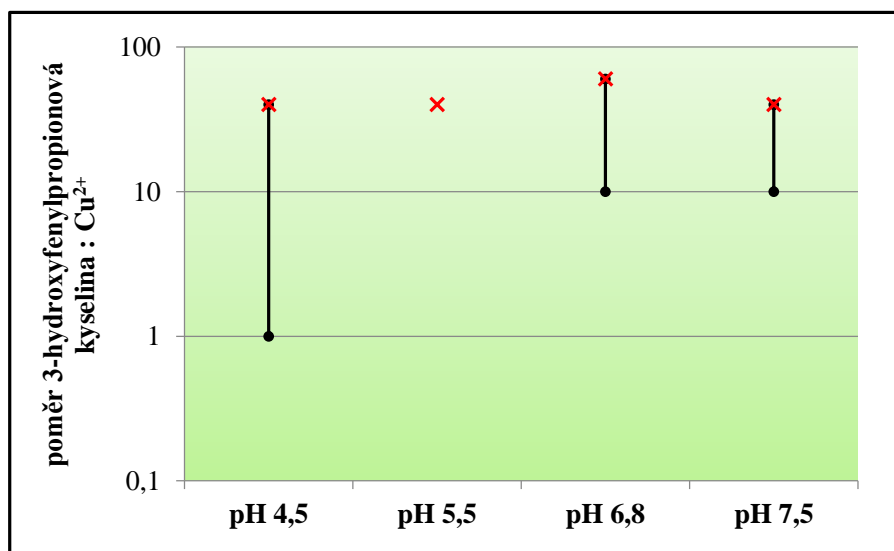
Obrázek 44: Měď redukující účinky kyseliny 3- hydroxyfenylpropionové při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky 3- hydroxyfenylpropionové kyseliny



Obrázek 45: Maximální měď redukující účinky 3- hydroxyfenylpropionové kyseliny v prostředí o různém pH

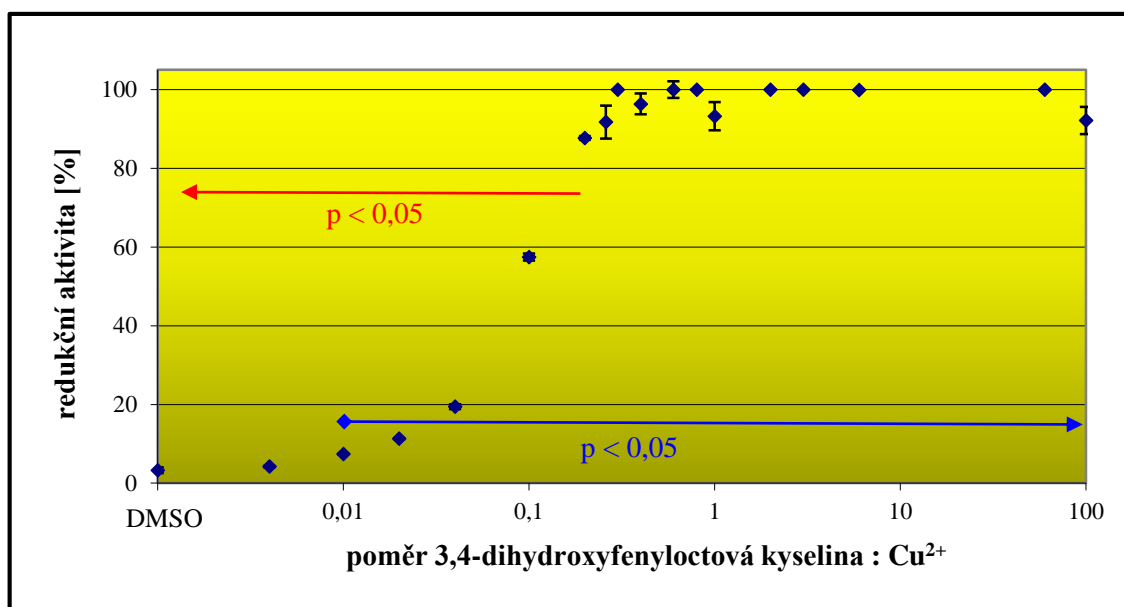
Poměr koncentrací 3- hydroxyfenylpropionové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků



Obrázek 46: Poměr koncentrací 3- hydroxyfenylpropionové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH

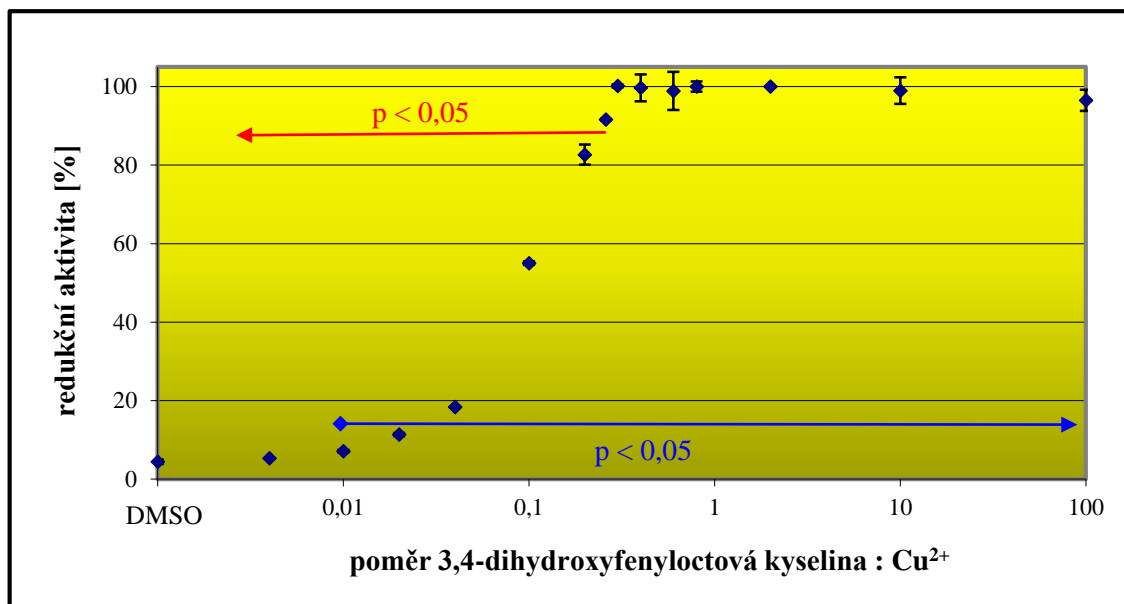
7.2.8. Měď redukující účinky kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové

pH 4,5



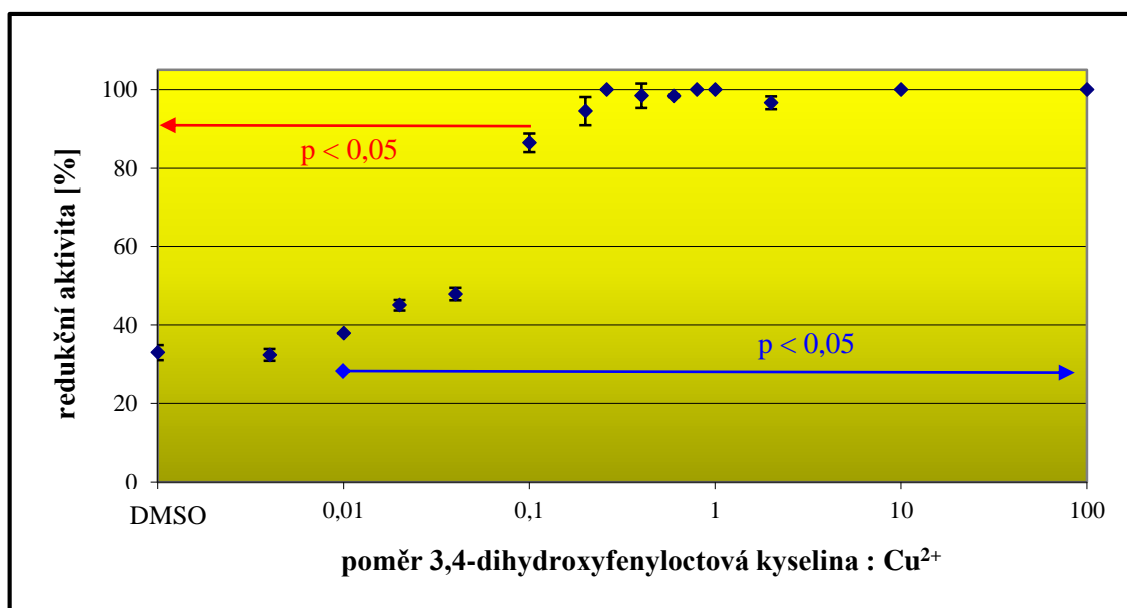
Obrázek 47: Měď redukující účinky kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové při pH 4,5 a čase 5 minut

pH 5,5



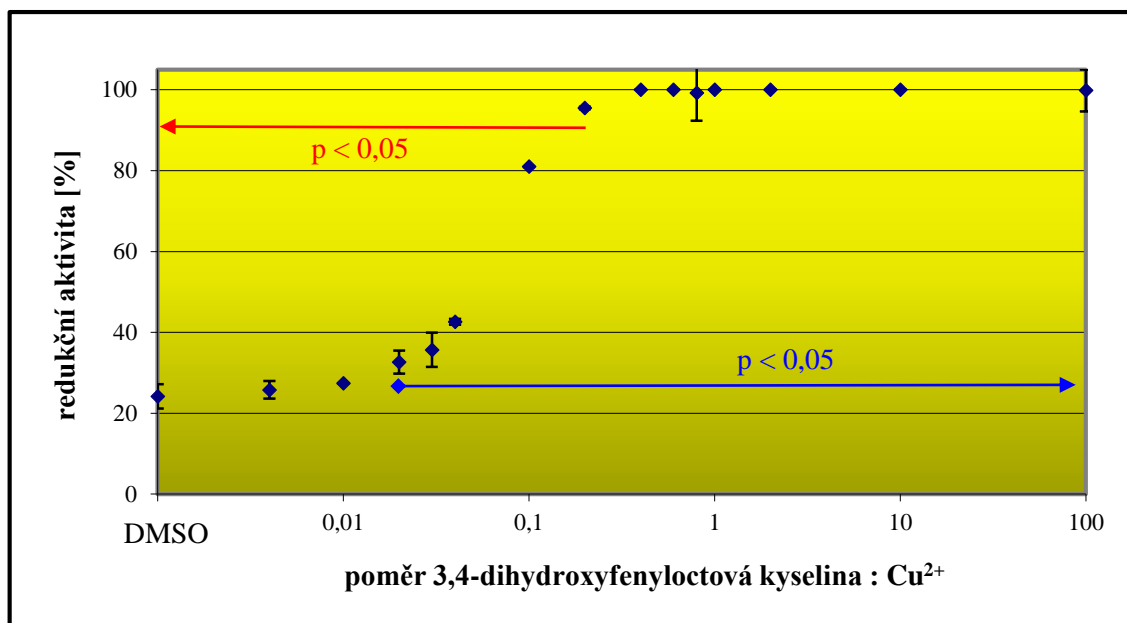
Obrázek 48: Měď redukující účinky kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové při pH 5,5 a čase 5 minut

pH 6,8



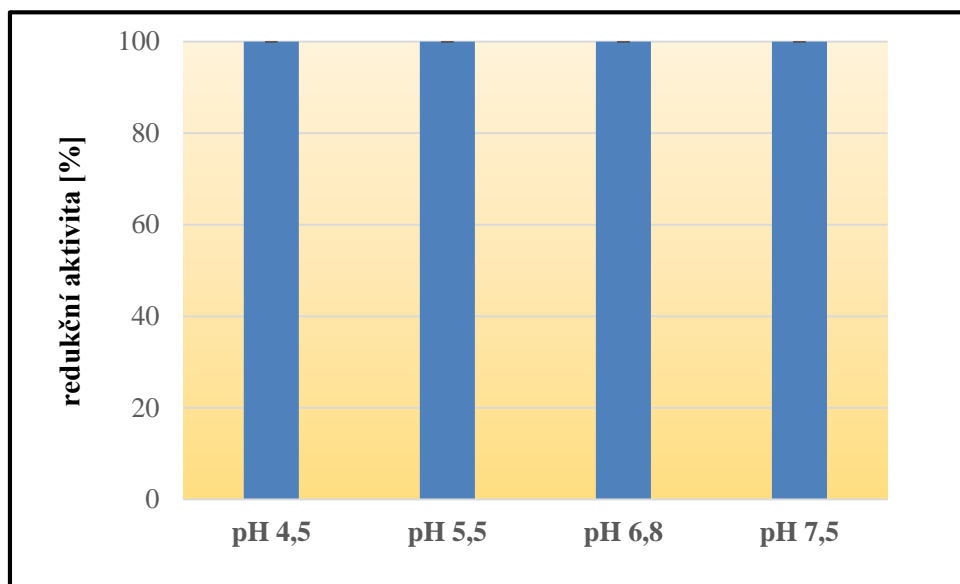
Obrázek 49: Měď redukující účinky kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové při pH 6,8 a čase 5 minut

pH 7,5



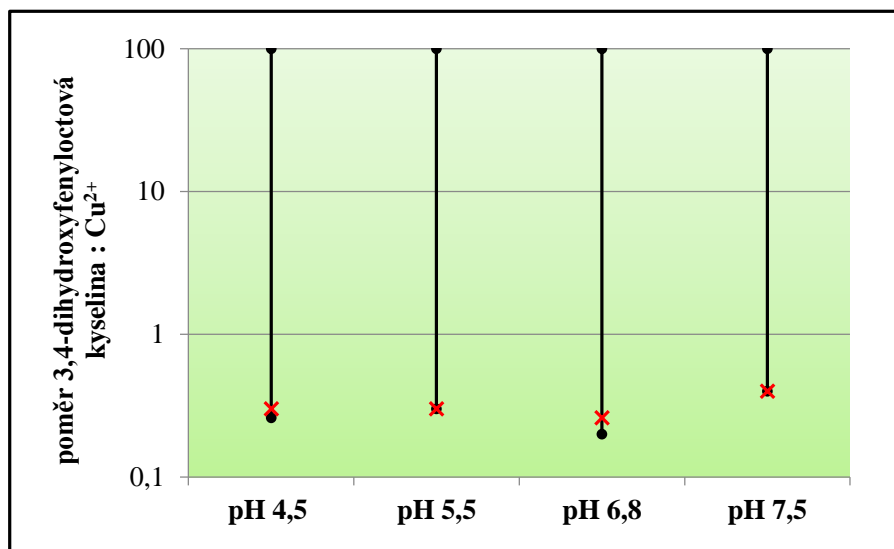
Obrázek 50: Měď redukující účinky kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové při pH 7,5 a čase 5 minut

Maximální měď redukující účinky 3,4- dihydroxyfenyloctové kyseliny



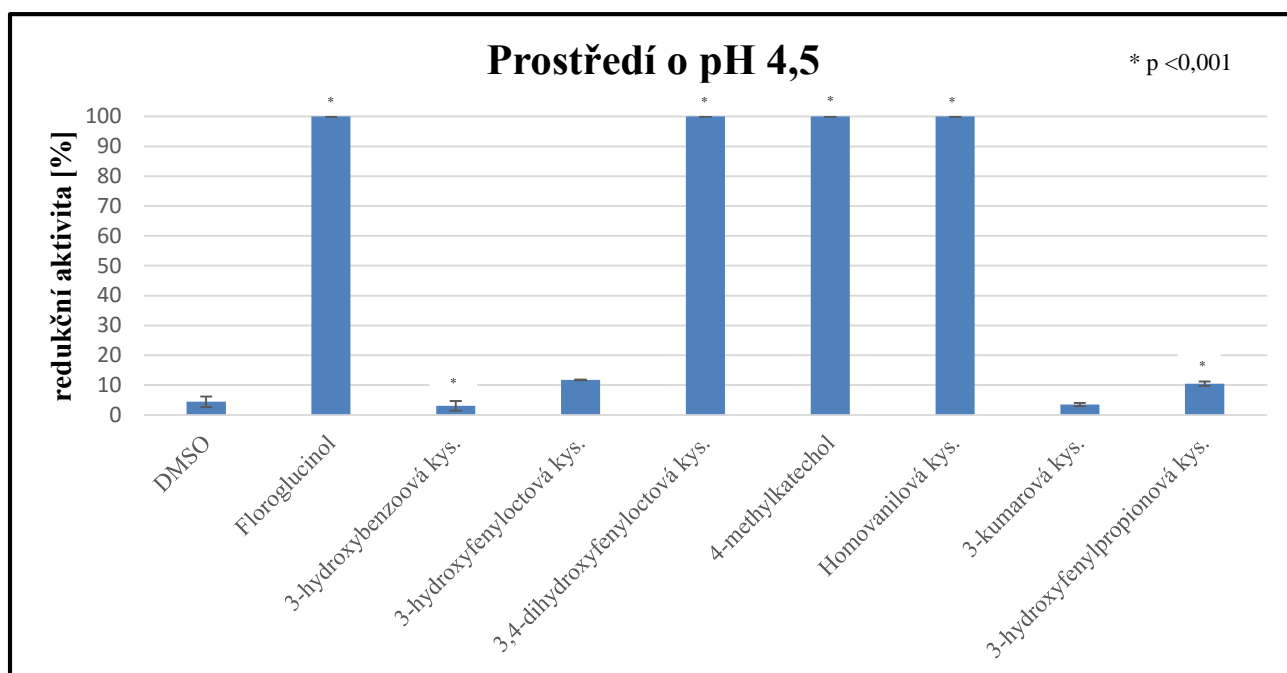
Obrázek 51: Maximální měď redukující účinky 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny v prostředí o různém pH

Poměr koncentrací 3,4- dihydroxyfenyloctové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků

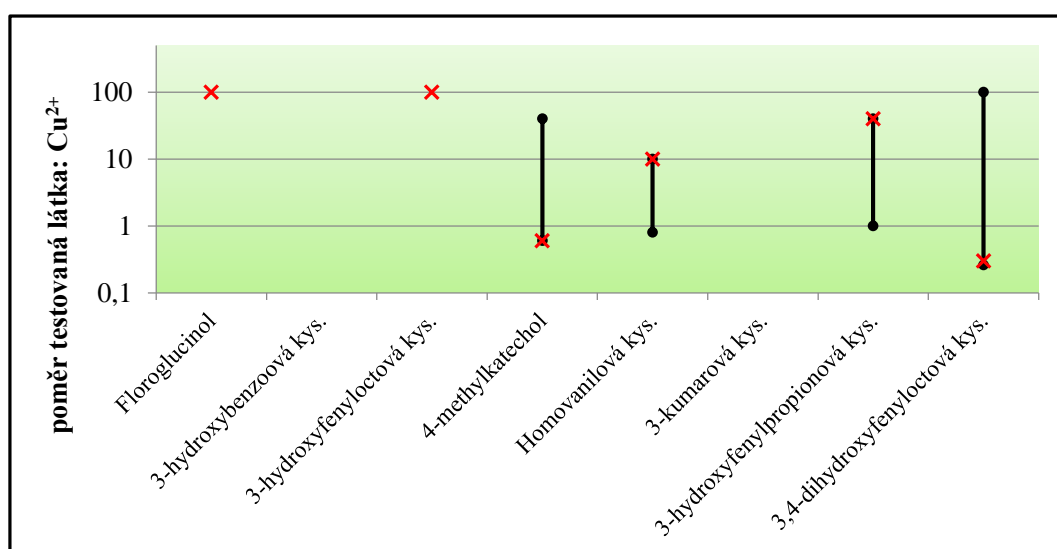


Obrázek 52: Poměr koncentrací 3,4- dihydroxyfenyloctové kyseliny a měďnatých iontů při dosažení maximálních měď redukujících účinků v prostředí o různém pH

7.2.9. Souhrn měř redukujících účinků při pH 4,5



Obrázek 53: Maximální měř redukující účinky testovaných metabolitů v prostředí o pH 4.5

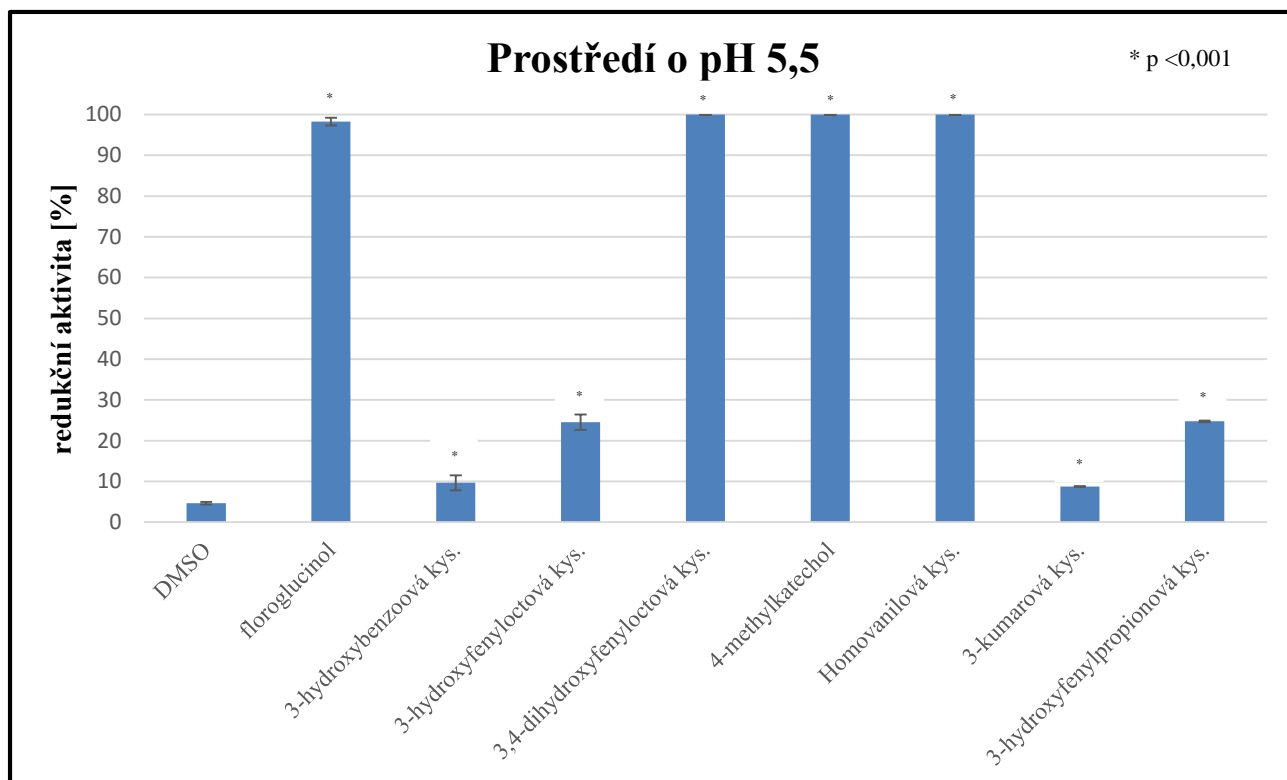


Obrázek 54: Poměr koncentrací testovaných metabolitů a měďnatých iontů při dosažení maximálních měř redukujících účinků v prostředí o pH 4.5

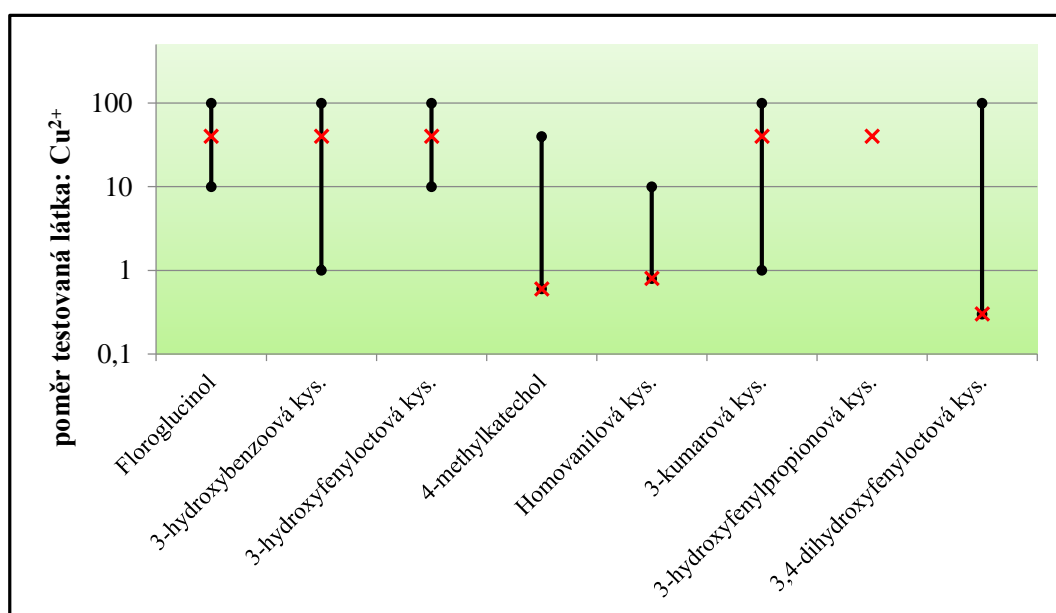
Tukey test mnohonásobného porovnávání	pH 4.5
floroglucinol vs. 3-hydroxybenzoová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	ns
floroglucinol vs. 4-methylkatechol	ns
floroglucinol vs. homovanilová kyselina	ns
floroglucinol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	ns
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kys.	p < 0,001
4-methylkatechol vs. homovanilová kyselina	ns
4-methylkatechol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
4-methylkatechol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-kumarová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001

Tabulka 4: Tukey test mnohonásobného porovnávání testovaných látek v prostředí o pH 4.5

7.2.10. Souhrn měř redukujících účinků při pH 5,5



Obrázek 55: Maximální měř redukující účinky testovaných metabolitů v prostředí o pH 5.5

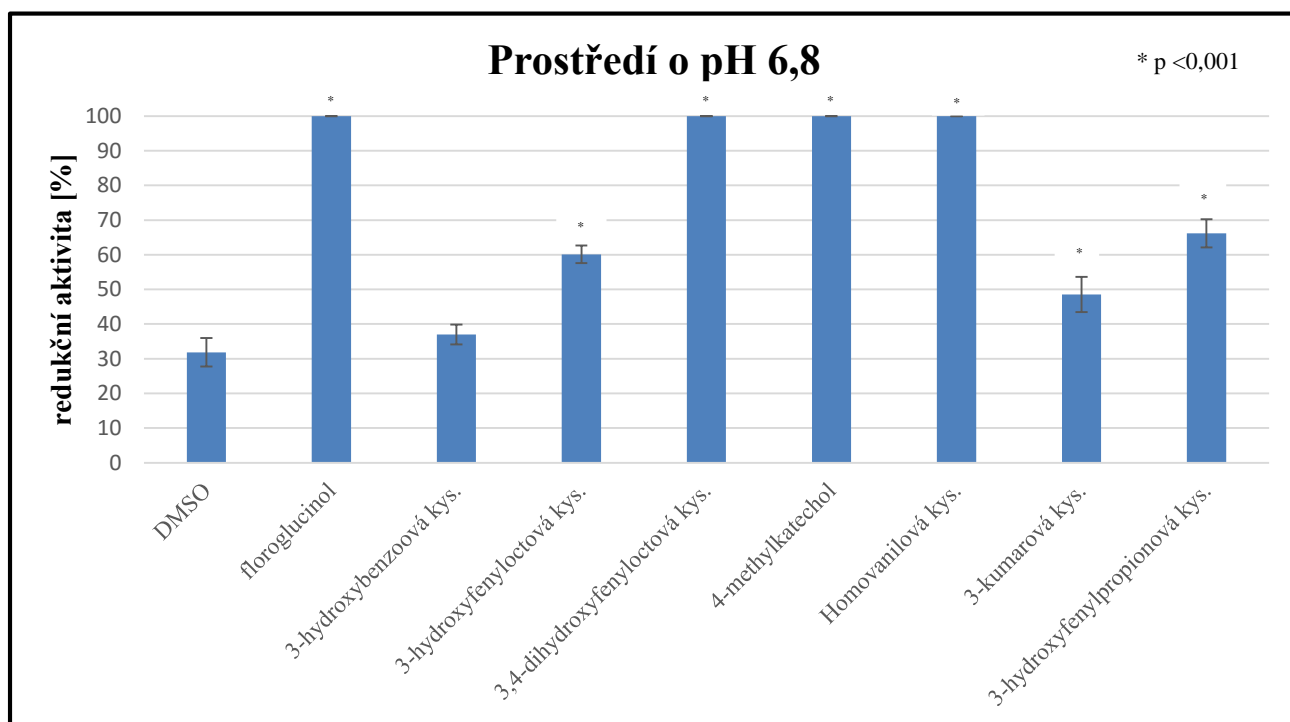


Obrázek 56: Poměr koncentrací testovaných metabolitů a měďnatých iontů při dosažení maximálních měř redukujících účinků v prostředí o pH 5.5

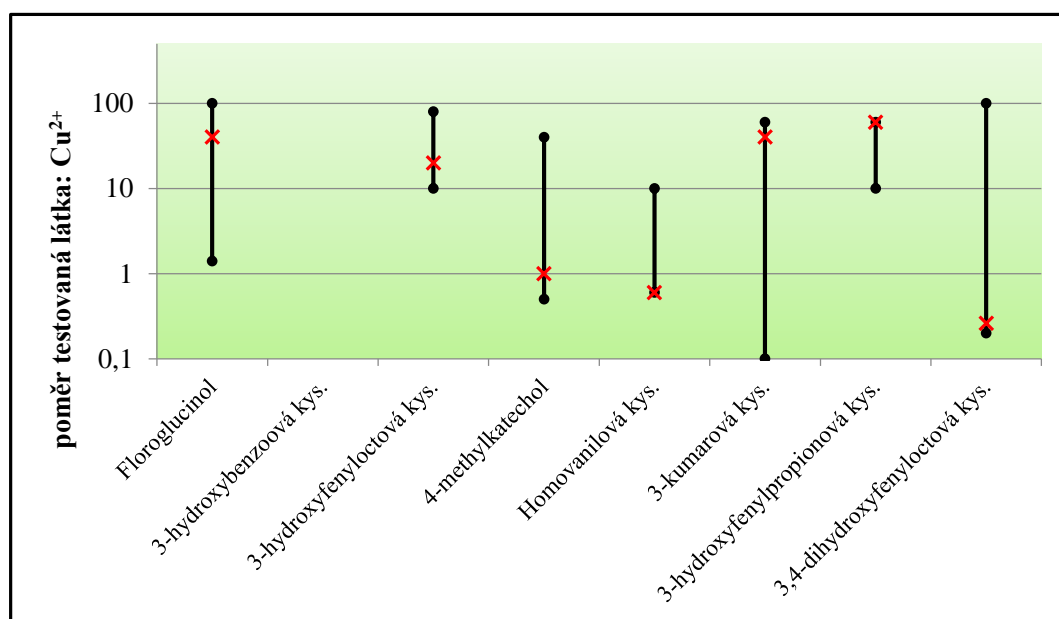
Tukey test mnohonásobného porovnávání	pH 5.5
floroglucinol vs. 3-hydroxybenzoová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	ns
floroglucinol vs. 4-methylkatechol	ns
floroglucinol vs. homovanilová kyselina	ns
floroglucinol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	ns
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kys.	p < 0,001
4-methylkatechol vs. homovanilová kyselina	ns
4-methylkatechol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
4-methylkatechol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-kumarová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001

Tabulka 5: Tukey test mnohonásobného porovnávání testovaných látek v prostředí o pH 5.5

7.2.11. Souhrn měř redukujících účinků při pH 6,8



Obrázek 57: Maximální měř redukující účinky testovaných metabolitů v prostředí o pH 6.8

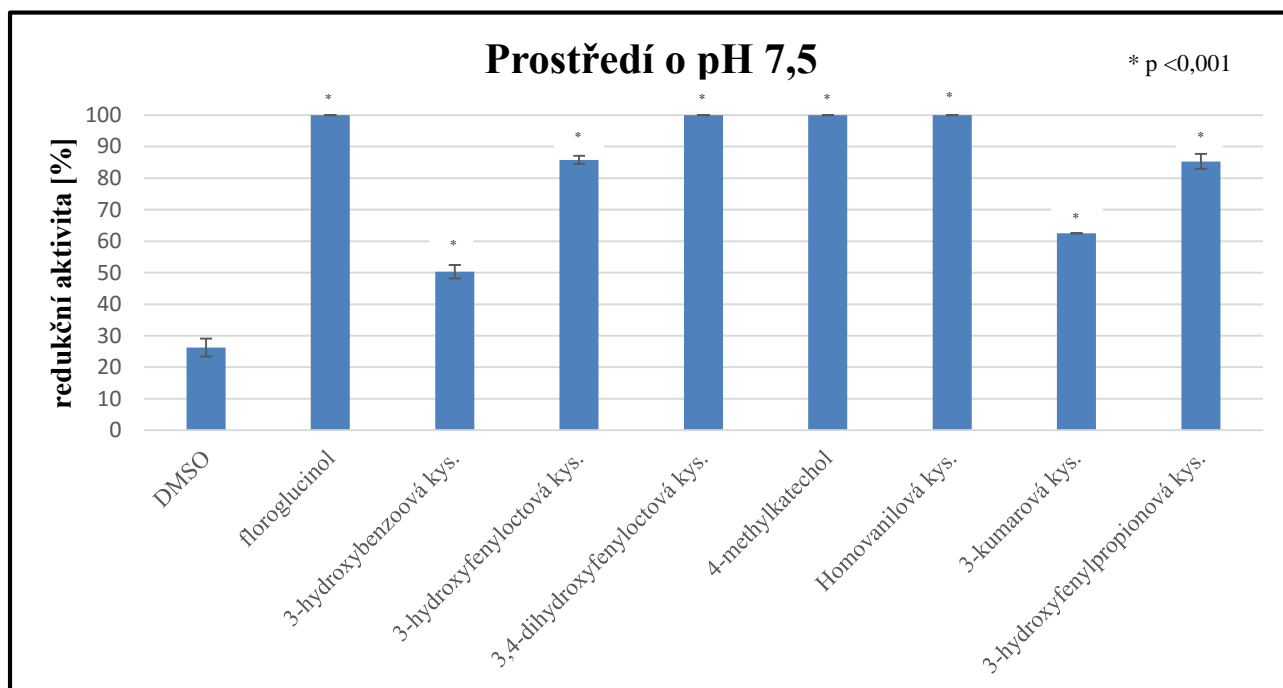


Obrázek 58: Poměr koncentrací testovaných metabolitů a měďnatých iontů při dosažení maximálních měř redukujících účinků v prostředí o pH 6.8

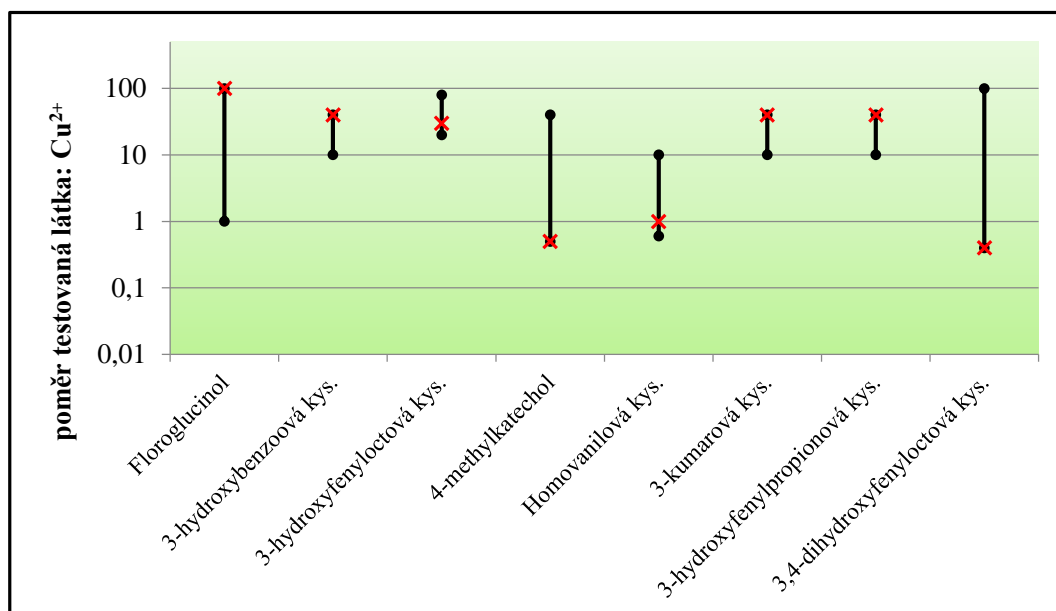
Tukey test mnohonásobného porovnávání	pH 6.8
floroglucinol vs. 3-hydroxybenzoová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	ns
floroglucinol vs. 4-methylkatechol	ns
floroglucinol vs. homovanilová kyselina	ns
floroglucinol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,05
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,05
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kys.	p < 0,001
4-methylkatechol vs. homovanilová kyselina	ns
4-methylkatechol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
4-methylkatechol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-kumarová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,01

Tabulka 6: Tukey test mnohonásobného porovnávání testovaných látek v prostředí o pH 6.8

7.2.12. Souhrn měř redukujících účinků při pH 7,5



Obrázek 59: Maximální měř redukující účinky testovaných metabolitů v prostředí o pH 7.5



Obrázek 60: Poměr koncentrací testovaných metabolitů a měďnatých iontů při dosažení maximálních měř redukujících účinků v prostředí o pH 7.5

Tukey test mnohonásobného porovnávání	pH 7.5
floroglucinol vs. 3-hydroxybenzoová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	ns
floroglucinol vs. 4-methylkatechol	ns
floroglucinol vs. homovanilová kyselina	ns
floroglucinol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
floroglucinol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3-hydroxybenzoová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3-hydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 4-methylkatechol	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. homovanilová kyselina	ns
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kys.	p < 0,001
4-methylkatechol vs. homovanilová kyselina	ns
4-methylkatechol vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
4-methylkatechol vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-kumarová kyselina	p < 0,001
homovanilová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001
3-kumarová kyselina vs. 3-hydroxyfenylpropionová kyselina	p < 0,001

Tabulka 7: Tukey test mnohonásobného porovnávání testovaných látek v prostředí o pH 7.5

8. Diskuze

Flavonoidy jsou poměrně hojně zastoupeny v běžné stravě (Mladěnka et al. 2010). Během procesu trávení jsou flavonoidy přeměňovány na malé fenolové kyseliny pomocí specifických bakterií v tlustém střevě. Vlastnosti flavonoidů byly relativně dobře prostudovány. To už ale neplatí pro jejich metabolity, které jsou vytvářeny až při průchodu trávicím traktem (Gao et al. 2006).

Je zde určitý předpoklad, že tyto jednoduché fenolové sloučeniny mohou být absorbovány do krevního řečiště. Mohou tak přispívat ke zdravotním benefitům při příjmu flavonoidů (Gao et al. 2006). Na druhou stranu mohou mít i negativní vliv. Tyto sloučeniny se mohou podílet na katalýze Fentonovy reakce, která produkuje reaktivní hydroxylové radikály (Ahuja et al. 2014).

Hlavním cílem této diplomové práce byla kvantifikace redukčních účinků mědi při čtyřech (pato)fyzilogicky relevantních pH u osmi metabolitů kvercetinu, tvořených lidskou mikroflórou (floroglucinol, 3- hydroxybenzoová kyselina, 3- hydroxyfenyloctová kyselina, 3,4- dihydroxyfenyloctová kyselina, 4- methylkatechol, homovanilová kyselina, 3- kumarová kyselina a 3- hydroxyfenylpropionová kyselina).

Pro naměření redukční aktivity jsme využili jednoduchou spektrofotometrickou metodu, založenou na indikátoru disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny, která má afinitu k měďným iontům. Redukční činidlo hydroxylamin hydrochlorid byl využit jako pozitivní kontrola se schopností kompletně redukovat měďnaté ionty. Výsledky byly odečítány ihned a poté po pěti minutách. Dle Říhy et al. 2013 dochází k tvorbě komplexu BCS s měďnými ionty postupně. V čase pět minut však již byla tvorba komplexu ukončena ve všech prostředích.

Floroglucinol vykazoval vysokou schopnost redukovat měďnaté ionty na ionty měďné. V prostředí o pH 4.5, 6.8 a 7.5 jsme u této látky naměřili 100% redukční aktivitu. Redukčního maxima dosahoval floroglucinol v prostředí o pH 4.5 při koncentračním poměru (poměr koncentrace floroglucinu a koncentrace testovaných měďnatých iontů) 100:1. Tento koncentrační poměr se snižoval se zvyšující se hodnotou pH prostředí. V prostředí o pH 7.5 bylo dosaženo maxima redukce již při koncentračním poměru 1:1. Vysoká schopnost redukce pravděpodobně spočívá v přítomnosti tří hydroxylových skupin na aromatickém jádře a nepřítomnosti dalších substituentů, které by mohly negativně ovlivňovat schopnost redukční aktivity.

I další testovaný metabolit, 4- methylkatechol, dosahoval vysoké redukční aktivity. Ve všech testovaných prostředích jsme zaznamenali 100% redukční aktivitu. V prostředích o pH 4.5 a 5.5 bylo dosaženo maxima redukce při koncentračním poměru 0,6:1, v prostředích o pH 6.8 a 7.5 byl

pak tento koncentrační poměr ještě nižší, 0,5:1. Tato testovaná látka se liší oproti dříve zmíněnému floroglucinolu v přítomnosti pouze dvou vzájemně sousedících hydroxylových skupin. Dále je na aromatickém jádře přítomna nejkratší možná alkylová skupina, methyl. Z výsledků vyplývá, že pro dosažení 100% redukční aktivity postačuje přítomnost právě dvou hydroxylových skupin. Přítomnost třetí hydroxylové skupiny na aromatickém kruhu nepřináší zvýšení redukční schopnosti látky. Příkladem může být 4- methylcatechol se dvěma hydroxylovými skupinami na aromatickém jádře, u kterého jsme naměřili stejně jako u floroglucinolu (tři hydroxylové skupiny) 100% hodnotu redukce. Této vysoké redukční aktivity však dosahoval 4- methylcatechol oproti floroglucinolu dokonce i při větším zředění (nižším koncentračním poměru). Z tohoto důvodu se může zdát, že pro redukci mědi je výhodnější přítomnost pouze dvou vzájemně sousedících hydroxylových skupin na aromatickém jádře. Mladěnka et al. 2010 ve své práci naznačuje, že pro redukci mědi má lokalizace hydroxylových skupin pouze minoritní vliv. Naše výsledky to potvrzují. Pro redukci mědi je důležitější počet hydroxylových skupin než jejich přesná lokalizace v molekule.

3,4- dihydroxyfenyloctová kyselina také dosáhla 100% redukční aktivity ve všech testovaných prostředích. Nejvyšší naměřené hodnoty redukce byly dosaženy při rozdílných koncentračních poměrech v závislosti na pH prostředí. Při pH 4.5 byl koncentrační poměr maximální dosažené hodnoty redukce 0,26:1, v prostředí o pH 5.5 0,3:1, při pH 6.8 pak 0,2:1 a konečně v prostředí o pH 7.5 byl tento poměr 0,4:1. Z výsledků koncentračních poměrů může vyplývat, že kyselina 3,4- dihydroxyfenyloctová nejnáze redukuje měďnaté ionty právě v prostředí o pH 6.8. Avšak i ve všech ostatních testovaných prostředích bylo dosaženo maxima redukce již při velmi nízkých koncentračním poměrech. Strukturně se jedná o aromatickou karboxylovou kyselinu, která je na aromatickém jádře substituována v polohách 3 a 4 dvěma hydroxylovými skupinami.

Posledním testovaným metabolitem kvercetin, který dosáhl 100% redukční aktivity ve všech testovaných pH byla kyselina homovanilová. V prostředích o pH 4.5 a 5.5 bylo dosaženo nejvyšší hodnoty redukce při koncentračním poměru 0,8:1. V prostředích o pH 6.8 a 7.5 byl pak koncentrační poměr ještě nižší, 0,6:1. Kyselina homovanilová má oproti předchozí zmíněné kyselině 3,4- dihydroxyfenyloctové pouze jednu hydroxylovou skupinu, přičemž místo druhé hydroxyskupiny má v poloze 3 methoxyskupinu.

Ze srovnání redukčních účinků kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové a kyseliny homovanilové se může jevit jako dostačující nahrazení jedné hydroxyskupiny stéricky objemnější methoxyskupinou. Stále je tak zachována schopnost dosáhnout 100% redukční aktivity. Kyselina 3,4- dihydroxyfenyloctová však dosahovala maxima redukce již při nižších koncentračních poměrech.

Kyselina 3- hydroxyfenyloctová se liší od kyseliny 3,4- dihydroxyfenyloctové pouze nepřítomností jedné hydroxylové skupiny. Tento strukturní rozdíl se projevil i v naměřených hodnotách maximální redukční aktivity. Jestliže kyselina 3,4- dihydroxyoctová měla vysokou redukční schopnost při všech testovaných pH (100%), pak kyselina 3- hydroxyfenyloctová dosáhla maximální hodnoty redukce od $11,79 \pm 0,11$ % (pH 4.5, koncentrační poměr 100:1) do $85,82 \pm 1,27$ % (pH 7.5, koncentrační poměr 30:1). Je zde výrazný vliv přítomnosti pouze jedné hydroxylové skupiny na aromatickém jádře. Oproti kyselině 3,4- dihydroxyfenyloctové tak bylo dosahováno celkově nižších hodnot redukční aktivity při vyšším koncentračním poměru. U tohoto metabolitu je zajímavé, že při vyšších koncentracích testované látky a pH prostředí (6.8, 7.5) docházelo ke zvratu účinků na chelatační, čímž se snížila redukční schopnost. Tento případ se zdá být podobný isoflavonoidům genisteinu a prunetinu (Karličková et al. 2015).

Podobných hodnot jako u kyseliny 3- hydroxyfenyloctové dosahoval i další testovaný metabolit kvercetin, kyselina 3- hydroxyfenylpropionová. Při koncentračním poměru 40:1 jsme naměřili u této kyseliny maximální redukční aktivitu $10,46 \pm 0,75$ % v prostředí o pH 4.5. Se zvyšujícím se pH prostředí se zvyšovala i maximální naměřená redukční aktivita. pH 5.5 ($24,27 \pm 0,21$ %, koncentrační poměr 40:1), pH 6.8 ($66,19 \pm 4,09$ %, koncentrační poměr 60:1) a pH 7.5 ($85,30 \pm 2,38$ %, koncentrační poměr 40:1). Kyselina 3- hydroxyfenylpropionová obsahuje také pouze jednu hydroxylovou skupinu na aromatickém jádře. Z porovnání těchto dvou aromatických kyselin vyplývá, že prodloužení řetězce o jeden uhlík má pravděpodobně jen malý vliv na snížení redukční aktivity měďnatých iontů.

Kyselina kumarová dosahovala v porovnání s ostatními testovanými látkami nižších hodnot maximální redukční aktivity. V naší nejkyselejší testovaném prostředí o pH 4.5 nebyla redukční schopnost statisticky vůbec významná oproti rozpouštědлу DMSO. V jiných prostředích jsme naměřili hodnoty redukčních účinků od 8,74% do 62,47%. Kyselina kumarová má opět pouze jednu hydroxylovou skupinu na aromatickém jádře a oproti předchozí zmíněné kyselině 3- hydroxyfenylpropionové obsahuje ve svém řetězci navíc dvojnou vazbu. Zdá se, že tento rozdíl může negativně ovlivnit redukční schopnost k měďnatým iontům.

Poslední testovanou látkou byla kyselina 3- hydroxybenzoová. U této kyseliny se maximální naměřená hodnota redukce lišila v závislosti na pH prostředí. V prostředí o pH 4.5 jsme naměřili nejvyšší hodnotu schopnosti redukce měďnatých iontů $5,03 \pm 0,59$ % při koncentračním poměru 100:1. Při pH 5.5 se redukční aktivita trochu zvýšila ($9,68 \pm 1,84$ %). Maximální redukční aktivita se zvyšovala se zvyšujícím se pH prostředí. Nejvyšší hodnotu redukční aktivity jsme však zaznamenali až při pH 7.5 ($50,31 \pm 2,15$ %). Této nejvyšší hodnoty redukce bylo dosaženo při koncentračním poměru 40:1. V porovnání s rozpouštědlem DMSO nebyla redukční aktivita v prostředí o pH 4.5 a 6.8 statisticky významná, zde se tak nedá hovořit o redukčním maximu.

Kyselina 3- hydroxybenzoová obsahuje pouze jednu hydroxylovou skupinu v poloze 3 na aromatickém jádře. U tohoto metabolitu kvercetinů jsme naměřili nejnižší hodnoty redukční aktivity ze všech hodnocených látek. Je patrné, že jedna izolovaná hydroxylová skupina má pouze nízký redukční potenciál. Jako jediná ze všech testovaných látek má kyselina 3- hydroxybenzoová napojenou karboxylovou skupinu přímo na aromatické jádro. To pravděpodobně může přispívat k nevýznamné schopnosti této látky redukovat měďnaté ionty na ionty měďné. Zajímavostí je, že při vyšším koncentračním poměru dochází u této látky ještě ke snížení redukční aktivity. To může být vysvětlováno schopností 3- hydroxybenzoové kyseliny částečně chelátovat ionty mědi při vyšším pH a vyšší koncentraci.

Obecně lze tak říci, že nejvyšších hodnot redukce dosahovaly testované látky, které měly v molekule zastoupení alespoň dvou hydroxylových skupin na aromatickém jádře. Redukce mědi je tak opravdu závislá zejména na počtu hydroxylových skupin v molekule (Mira et al. 2002).

Z této diplomové práce vyplývá, že nejvyšší měď redukční aktivitu vykazovaly sloučeniny, které mají v molekule *o*- dihydroxylové uspořádání. Tyto látky dosahovaly 100% redukce iontů mědi již při nízkém koncentračním poměru k těmto iontům.

Zajímavostí je, že pokud byla nahrazena jedna hydroxylová skupina objemnější skupinou methoxylovou (kyselina homovanilová), redukční aktivita byla stále významná a dosahovala i tak hodnot 100%.

Naopak nejnižší redukční aktivitou disponovaly testované látky, které měly pouze jednu izolovanou hydroxylovou skupinu. Karlíčková et al. 2015 ve své práci poukazuje na zvyšující se redukční potenciál v závislosti na přechodu pH z kyselého do neutrálního prostředí. Také u všech našich testovaných metabolitů docházelo ke zvýšení redukční aktivity se zvyšujícím se pH prostředí.

9. Závěr

Na základě jednoduché spektrofotometrické metody, založené na indikátoru disodné soli bathocuproindisulfonové kyseliny, jsme kvantifikovali měď redukující účinky u osmi vybraných metabolitů kvercetinu (floroglucinol, 3- hydroxybenzoová kyselina, 3- hydroxyfenyloctová kyselina, 3,4- dihydroxyfenyloctová kyselina, 4- methylnatechol, homovanilová kyselina, 3- kumarová kyselina a 3- hydroxyfenylpropionová kyselina) ve čtyřech prostředích o různém pH (4.5, 5.5, 6.8 a 7.5).

Nejvyšších redukčních účinků dosáhly metabolity kvercetinu floroglucinol, 4- methylnatechol, 3,4- dihydroxyfenyloctová kyselina a homovanilová kyselina. Tyto metabolity jako jediné ze všech testovaných látek dosáhly redukční aktivity 100%. Kyselina 3- hydroxyfenyloctová a kyselina 3- hydroxyfenylpropionová vykazovaly již nižší redukční aktivitu v závislosti na pH prostředí. Nejnižší redukční aktivita byla naměřena u 3- kumarové kyseliny a 3- hydroxybenzoové kyseliny.

Z výsledků je patrné, že je zde významný vliv struktury molekuly na příslušnou měď redukující aktivitu. Přesná lokalizace hydroxylových skupin hraje jen minoritní roli při vlivu na měď redukční účinky. Z tohoto pohledu se zdá být významnější samotný počet hydroxylových skupin v molekulách metabolitů kvercetinu. Nejvyšší redukční aktivity vůči měďnatým iontům dosahovaly látky, které ve své molekule obsahovaly alespoň dvě hydroxylové skupiny (např. 4- methylnatechol nebo kyselina 3,4- dihydroxyfenyloctová), případně vzájemně sousedící jednu hydroxylovou a jednu methoxylovou skupinu (kyselina homovanilová). Naopak pouze jedna izolovaná hydroxylová skupina měla jen malý vliv na měď redukční aktivitu molekuly.

10. Seznam použitých zkratek

ACE	Angiotenzin konvertující enzym
ATOX	Antioxidační protein 1
ATP	Adenosintrifosfát
BCS	Disodná sůl bathocuproindisulfonové kyseliny
COX17	Chaperon mědi pro cytochrom c oxidázu
CTR1	Transportní protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
GABA	Gama- aminomáselná kyselina
HA	Hydroxylamin
NMDA	N- methyl- D- asparagová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SGLT- 1	Sodno- glukózový transportní protein 1

11. Seznam použité literatury

1. Ahuja A, Dev K, Tanwar RS, Selwal KK, Tyagi PK. Copper mediated neurological disorder: visions into amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer and Menkes disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2015 Jan; 29: 11- 23.
2. Alafiatayo AA, Syahida A, Mahmood M. Total antioxidant capacity, flavonoid, phenolic acid and polyphenol content in ten selected species of Zingiberaceae rhizomes. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 2014 Apr 3; 11(3): 7- 13.
3. Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J. Reprod. Infertil.* 2013 Oct; 14(4): 158- 72.
4. Brewer GJ. The promise of copper lowering therapy with tetrathiomolybdate in the cure of cancer and in the treatment of inflammatory disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2014 Oct; 28(4): 372- 8.
5. Cao DJ, Hill JA. Copper futures: ceruloplasmin and heart failure. *Circ. Res.* 2014 May 23; 114(11): 1678- 80.
6. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev.* 2010 Mar; 68(3): 133- 47.
7. Davies M. N., Yáñez A. J. *Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology.* 1. Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2013. ISBN: 978- 0- 470- 57871- 1.
8. Dusek P, Litwin T, Czlonkowska A. Wilson disease and other neurodegenerations with metal accumulations. *Neurol. Clin.* 2015 Feb; 33(1): 175- 204.
9. Foy SP, Labhasetwar V. Oh the irony: Iron as a cancer cause or cure? *Biomaterials.* 2011 Dec; 32(35): 9155- 8.
10. Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 2014 Nov; 88(11): 1929- 38.
11. Gao K, Xu A, Krul C, Venema K, Liu Y, Niu Y, Lu J, Bensoussan L, Seeram NP, Heber D, Henning SM. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4- dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* 2006 Jan; 136(1): 52- 7.
12. Ghosh S, Chaudhuri S. Menkes kinky hair syndrome: a case report. *Dermatol. Online J.* 2012 Nov 15; 18(11): 4.
13. Hordyjewska A, Popiołek Ł, Kocot J. The many "faces" of copper in medicine and treatment. *Biometals.* 2014 Aug; 27(4): 611- 21.
14. Hosseinzadeh H, Nassiri-Asl M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J. Endocrinol. Invest.* 2014 Sep; 37(9): 783- 8.

15. Indo HP, Yen HC, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, Matsui H, Gusev O, Cornette R, Okuda T, Minamiyama Y, Ichikawa H, Suenaga S, Oki M, Sato T, Ozawa T, Clair DK, Majima HJ. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2015 Jan; 56(1): 1- 7.
16. Jordán V, Hemzalová M. Antioxidanty: zázračné zbraně: vitaminy, minerály, stopové prvky, aminokyseliny a jejich využití pro zdravý život. 1. vydání. Brno: Jota, 2001. ISBN 80- 7217- 156-9.
17. Karlíčková J, Macáková K, Říha M, Pinheiro LM, Filipický T, Horňasová V, Hrdina R, Mladěnka P. Isoflavones Reduce Copper with Minimal Impact on Iron In Vitro. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015; 2015: 437381.
18. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 1998 Feb; 21(1): 17- 23.
19. Kelly GS. Quercetin. *Monograph. Altern. Med. Rev.* 2011 Jun; 16(2): 172- 94.
20. Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv. Nutr.* 2012 Jan; 3(1): 39- 46.
21. Lutsenko S, Gupta A, Burkhead JL, Zuzel V. Cellular multitasking: the dual role of human Cu- ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008 Aug 1; 476(1): 22- 32.
22. Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* 2002 Nov; 36(11): 1199- 208.
23. Mladěnka P, Macáková K, Filipický T, Zatloukalová L, Jahodář L, Bovicelli P, Silvestri IP, Hrdina R, Saso L. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J. Inorg. Biochem.* 2011 May; 105(5): 693- 701.
24. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2010 Sep 15; 49(6): 963- 75.
25. Montes S, Rivera-Mancia S, Diaz-Ruiz A, Tristan-Lopez L, Rios C. Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014; 2014: 147251.
26. Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. *Mol. Nut. Food Chem.* 2016, in press.
27. Parthasarathy S, Yoo B, McElheny D, Tay W, Ishii Y. Capturing a reactive state of amyloid aggregates: NMR-based characterization of copper-bound Alzheimer disease amyloid β -fibrils in a redox cycle. *J. Biol. Chem.* 2014 Apr 4 ;289(14): 9998- 10010.

28. Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. A review and current perspective on Wilson disease. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2013 Dec; 3(4): 321- 36.
29. Rice- Evans C., Packer L. *Flavonoids in health and disease*. 2. Edition. New York: Marcel Dekker, Inc. 2003. ISBN: 0- 8247- 4234- 6.
30. Russo GL, Russo M, Spagnuolo C. The pleiotropic flavonoid quercetin: from its metabolism to the inhibition of protein kinases in chronic lymphocytic leukemia. *Food Funct.* 2014 Oct; 5(10): 2393- 401.
31. Říha M, Karličková J, Filipský T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *J. Inorg. Biochem.* 2013 Jun; 123: 80- 7.
32. Safi R, Nelson ER, Chitneni SK, Franz KJ, George DJ, Zalutsky MR, McDonnell DP. Copper signaling axis as a target for prostate cancer therapeutics. *Cancer Res.* 2014 Oct 15; 74(20): 5819- 31.
33. Sezer OB, Perk P, Hoşnut FÖ, Köse SK, Özcay F. Is it necessary to re-evaluate diagnostic criteria for Wilson disease in children? *Turk. J. Gastroenterol.* 2014 Dec; 25(6): 690- 5.
34. Slanina J, Táborská E. Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy* 98, 2004, 239– 245.
35. Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2012 Sep 15; 53(6): 1252- 63.
36. Štípek S a kolektiv. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1. vydání. Praha: Grada, 2000. ISBN 80- 7169- 704- 4.
37. Terao J, Murota K, Kawai Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* 2011 Jan; 2(1): 11- 7.
38. Tümer Z, Møller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet.* 2010 May; 18(5): 511- 8.
39. Turnlund JR. Human whole-body copper metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998 May; 67(5 Suppl): 960S- 964S.
40. Wijmenga C, Klomp LW. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc. Nutr. Soc.* 2004 Feb; 63(1): 31- 9.